



BACHELORARBEIT

Frau

Isabell Saleski

**Etablierung von in-vitro-Test-
systemen zur Abschätzung
von Lichtschutzwirkung und
Irritationspotenzial
kosmetischer Produkte**

Mittweida, 2011

BACHELORARBEIT

Etablierung von in-vitro-Test-systemen zur Abschätzung von Lichtschutzwirkung und Irritationspotenzial kosmetischer Produkte

Autor:

Isabell Saleski

Studiengang:

Biotechnologie/Bioinformatik

Seminargruppe:

BI08w2-B

Erstprüfer:

Prof. Dr. rer. nat. Petra Radehaus

Zweitprüfer:

Dipl.-Ing. (FH) Antje Schneider

Einreichung:

Mittweida, 26.08.2011

Verteidigung/Bewertung:

Mittweida, 2011

Bibliografische Beschreibung:

Saleski, Isabell:

Etablierung von in-vitro-Testsystemen zur Abschätzung von Lichtschutzwirkung und Irritationspotenzial kosmetischer Produkte – 2011 – 48 S.

Mittweida, Hochschule Mittweida, Fakultät Mathematik/ Naturwissenschaften/ Informatik, Bachelorarbeit, 2011

Referat:

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit biologischen und physiko-chemischen in-vitro-Testsystemen zur Bestimmung der Lichtschutzwirkung und des Irritationspotenzials von kosmetischen Fertigprodukten.

Für die Abschätzung der Lichtschutzwirkung wurde eine Screening-Methode für orientierende und vergleichende Untersuchungen von Sonnenschutzpräparaten in Lösungen entwickelt. Die Methode ermöglicht außerdem eine Abschätzung der Photostabilität der Produkte sowie der verbleibenden Lichtschutzwirkung nach der Einwirkung von ultravioletter Strahlung.

Zur Abschätzung des Irritationspotenzials wurde überprüft, ob sich der Red-blood-cell-Photohämolysetest für kosmetische Fertigprodukte eignet. Es wurden sowohl der Einfluss der chemischen Inhaltsstoffe als auch die Beeinflussung des Testsystems durch UV-Strahlung untersucht.

Inhalt

Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
1 Einleitung.....	1
1.1 Zielstellung.....	2
2 Theoretische Grundlagen.....	3
2.1 Sonnenschutzmittel.....	3
2.1.1 Strahlungsspektrum der Sonne.....	3
2.1.2 UV-Filter in Sonnenschutzpräparaten	4
2.1.3 Lichtschuttfaktor	6
2.1.4 UVA-Schutz	7
2.1.5 Photostabilität von UV-Filtersubstanzen	8
2.2 Photosensibilisierung	9
2.3 Erythrozyten.....	10
2.3.1 Erythrozytenmembran.....	11
2.3.2 Hämoglobin.....	11
2.3.3 Hämolyse	13
2.4 Photohämolyse von Erythrozyten.....	14
3 Material	16
3.1 Chemikalien	16
3.2 Geräte	17

4	Methoden und Ergebnisse.....	18
4.1	<i>Photometrische Untersuchungen</i>	18
4.1.1	Bestimmung des linearen Messbereichs	18
4.1.1.1	Methode	18
4.1.1.2	Ergebnisse	19
4.1.2	Absorptionsmessungen für Sonnenschutzcreme	21
4.1.2.1	Methode	21
4.1.2.2	Ergebnisse	22
4.1.3	Überprüfung der Photostabilität.....	25
4.1.3.1	Methode	25
4.1.3.2	Ergebnisse	26
4.2	<i>RBC-Test.....</i>	27
4.2.1	Herstellung der Pufferlösungen	27
4.2.2	Herstellung der RBC-Suspension.....	28
4.2.3	Aufnahme des Absorptionsspektrums von Hämoglobin	29
4.2.3.1	Methode	30
4.2.3.2	Ergebnisse	31
4.2.4	SDS-abhängiger Red-blood-cell-Test.....	33
4.2.4.1	Methode	33
4.2.4.2	Ergebnisse	35
4.2.5	Überprüfung der Bestrahlungsgleichmäßigkeit.....	36
4.2.5.1	Methode	36
4.2.5.2	Ergebnisse	37
4.2.6	Einfluss der Bestrahlungsdauer auf die Hämolyserate	37
4.2.6.1	Methode	38
4.2.6.2	Ergebnisse	38
4.2.7	RBC-Photohämolysetest für Sonnenschutzcreme	39
4.2.7.1	Methode	39
4.2.7.2	Ergebnisse	41
4.2.8	Überprüfung der Reproduzierbarkeit	42
4.2.8.1	Methode	43
4.2.8.2	Ergebnisse	44

5	Fazit.....	47
	Literatur	49
	Anlagen	53
	Anlagen, Teil 1.....	A
	Anlagen, Teil 2.....	B
	Anlagen, Teil 3.....	C
	Selbstständigkeitserklärung	

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Spektralbereiche des Sonnenlichts [BODE, 2004].....	3
Abbildung 2: Erythrozyten in ihrer Normalform als bikonkave Scheiben [LANG & LANG, 2007]	11
Abbildung 3: Hämoglobin (PDB:1GZX), vier Untereinheiten (Bändermodell) mit prosthetischer Gruppe Häm (Stäbchenmodell, grau)	12
Abbildung 4: Absorptionsspektrum von Hämoglobin mit intensivstem Absorptionsmaximum bei 416 nm [Bode, 2004].....	13
Abbildung 5: Photohämolyse eines Erythrozyten, schematische Darstellung [nach BODE, 2004].....	15
Abbildung 6: Absorptionsspektren von Sonnenschutzcreme LSF 6 und LSF 50	19
Abbildung 7: Abhängigkeit der Absorption von der Konzentration (LSF 6).....	20
Abbildung 8: Abhängigkeit der Absorption von der Konzentration (LSF 50).....	21
Abbildung 9: Transmissionsspektrum für Probe "50 % LSF 6 / 50 % LSF 50"	23
Abbildung 10: Absorptionsspektrum für Probe "50 % LSF 6 / 50 % LSF 50"	23
Abbildung 11: Absorptionen in Abhängigkeit vom Anteil der Sonnenschutzcreme mit LSF 50 in der Probenzusammensetzung	24
Abbildung 12: Vergleich der Absorptionen im UVB-Bereich mit und ohne UV- Bestrahlung	26
Abbildung 13: Vergleich der Absorptionen im UVA-Bereich mit und ohne UV- Bestrahlung	27
Abbildung 14: Herstellen der RBC-Suspension.....	29

Abbildung 15: Totalhämolyse durch Aqua dest.; mit UV-Bestrahlung.....	31
Abbildung 16: Totalhämolyse durch Aqua dest.; ohne UV-Bestrahlung.....	32
Abbildung 17: Totalhämolyse durch Gefrieren; mit UV-Bestrahlung	32
Abbildung 18: Totalhämolyse durch Gefrieren; ohne UV-Bestrahlung.....	32
Abbildung 19: Abhängigkeit der Hämolyse von der SDS-Konzentration bei verschiedenen Wellenlängen	35
Abbildung 20: Versuchsaufbau zur Probenbestrahlung	36
Abbildung 21: Abhängigkeit der Hämolyse von der Bestrahlungsdauer	38
Abbildung 22: Abhängigkeit der Hämolyserate von der Konzentration an Sonnenschutzcreme LSF 6.....	41
Abbildung 23: Abhängigkeit der Hämolyserate von der Konzentration an Sonnenschutzcreme LSF 50.....	42
Abbildung 24: Abhängigkeit der gemittelten Hämolyserate von der Probenkonzentration sowie Standardabweichungen (Sonnenschutzcreme LSF 6)	45
Abbildung 25: Abhängigkeit der gemittelten Hämolyserate von der Probenkonzentration sowie Standardabweichungen (Sonnenschutzcreme LSF 50).....	45

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Beispiele für chemische UV-Filter.....	5
Tabelle 2: Verdünnungsstufen	19
Tabelle 3: Probenzusammensetzungen	22
Tabelle 4: Eingesetzte Proben für den Photostabilitätstest	25
Tabelle 5: Testlösungen für Totalhämolyse.....	30
Tabelle 6: Absorptionsmaxima von Hämoglobin in verschiedenen Testansätzen	31
Tabelle 7: SDS-Verdünnungen	34
Tabelle 8: Für die jeweiligen Kavitäten der Mikrotiterplatte ermittelte Absorptionen	37
Tabelle 9: Probenverdünnungen für RBC-Photohämolysetest.....	40
Tabelle 10: Pipettierschema zur Herstellung der Testlösungen und Blindwerte..	40
Tabelle 11: Probenverdünnungen zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit	43
Tabelle 12: Pipettierschema zur Herstellung der Testlösungen und Blindwerte für die Überprüfung der Reproduzierbarkeit	44

Abkürzungsverzeichnis

Aqua dest.	Aqua destillata / destilliertes Wasser
BW	Blindwert
IPD	Immediate pigment darkening / Sofortpigmentierung
LSF	Lichtschutzfaktor
MED	Minimale Erythemdosis
MW	Mittelwert
PBS	Phosphate buffered saline / Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PPD	Persistent pigment darkening / Anhaltende Pigmentierung
RBC	Red blood cells / Rote Blutkörperchen / Erythrozyten
SDS	Sodium dodecyl sulfate / Natriumlaurylsulfat
UV	Ultraviolett
VK	Variationskoeffizient

1 Einleitung

Die Qualität von Hautpflegeprodukten zeichnet sich in entscheidendem Maße über ihre Hautverträglichkeit aus. Sehr gute Hautpflegemittel lösen keine Hautirritationen aus, das heißt keine objektiv beobachtbaren oder subjektiv beschreibbaren Entzündungen der Haut wie beispielsweise Erythembildung oder Juckreiz. Sie dürfen keine allergischen Reaktionen verursachen.

Diese Eigenschaften werden in dermatologischen Verträglichkeitsprüfungen unter ärztlicher Kontrolle und mit Hilfe von in-vitro-Testsystemen, die oftmals in einer frühen Phase der Produktentwicklung eingesetzt werden, überprüft. Im Gegensatz zu in-vivo-Testsystemen werden in-vitro-Testsysteme nicht im lebenden Organismus, sondern unter experimentellen Bedingungen außerhalb des Organismus eingesetzt.

Neben der Ermittlung des Hautirritationspotenzials ist es wichtig, dass kosmetische Produkte auch auf ihre phototoxischen bzw. photosensibilisierenden Eigenschaften untersucht werden. Darunter versteht man die durch Licht oder UV-Strahlung induzierten toxikologischen Wirkungen eines Stoffes. Das Hautirritationspotenzial wird durch die äußerliche Anwendung eines Hautpflegeproduktes und anschließender Einwirkung von UV-Licht erhöht, obwohl die Strahlendosis in einem Bereich liegt, in dem sie normalerweise keine Auswirkungen hätte. Die Überprüfung der UV-induzierten Eigenschaften ist vor allem für kosmetische Produkte von Bedeutung, die der Sonne exponiert werden, wie z.B. Gesichtscremes oder Sonnenschutzpräparate. Die Ermittlung der Photosensibilisierung kann in-vitro durch den Vergleich des Irritationspotenzials mit und ohne UV-Bestrahlung erfolgen. Ein Beispiel dafür ist der Red-blood-cell-Photohämolysetest (RBC-Photohämolysetest), bei dem die Membranstabilität exponierter Erythrozyten gegen Standards gemessen wird.

Für Sonnenschutzprodukte ist weiterhin der Nachweis der Schutzwirkung im UVA- und UVB-Bereich von Bedeutung. Da die Standardisierung zur Bestimmung des

UVA-Schutzfaktors noch nicht sehr weit fortgeschritten ist, besteht auch hier der Bedarf an weiterführenden Betrachtungen zu in-vitro-Testsystemen.

1.1 Zielstellung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Überprüfung verschiedener in-vitro-Testsysteme auf ihre Anwendbarkeit für kosmetische Produkte.

Es soll überprüft werden, ob der Red-blood-cell-Photohämolysetest, der in seiner Ursprungsform für Verdünnungen von reinen Substanzen entwickelt wurde [PAPE & PFANNENBECKER, 1994], auch für komplexe Zusammensetzungen kosmetischer Produkte geeignet ist und ein Photohämolysepotenzial für diese abgeschätzt werden kann. Bei den untersuchten Produkten handelt es sich um zwei Sonnenschutzcremes mit den Lichtschutzfaktoren (LSF) 6 und 50. Es soll überprüft werden, ob sich deren Lichtschutzwirkung ebenfalls mit dem RBC-Photohämolysetest nachweisen lässt.

Für die Sonnenschutzcremes sollen außerdem die Absorptions- und Stabilitätseigenschaften der UV-Schutzfilter in-vitro überprüft werden. Dazu wird eine Screening-Methode mit Verdünnungslösungen etabliert, die orientierende und vergleichende Aussagen zwischen verschiedenen Sonnenschutzpräparaten ermöglichen soll.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Sonnenschutzmittel

2.1.1 Strahlungsspektrum der Sonne

Die elektromagnetische Strahlung der Sonne umfasst den Bereich der Infrarotstrahlung (IR, 800 – 3000 nm), des sichtbaren Lichtes (VIS, 400 – 800 nm) und der Ultraviolettstrahlung (UV, 200 – 400 nm). Die UV-Strahlung wird dabei noch weiter unterteilt: UVC-Strahlung mit Wellenlängen von 200 – 290 nm, UVB-Strahlung im Bereich 290 – 320 nm und UVA mit Wellenlängen zwischen 320 und 400 nm [MANG & KRUTMANN, 2003]. Teilweise wird die langwellige UVA-Strahlung weiter in die Bereiche UVA1 und UVA2 unterteilt, siehe Abbildung 1. Durch die Atmosphäre und die Ozonschicht wird UVC vollkommen absorbiert, sodass nur langwelligere Strahlung auf die Erdoberfläche trifft [SCHRADER, 2001].

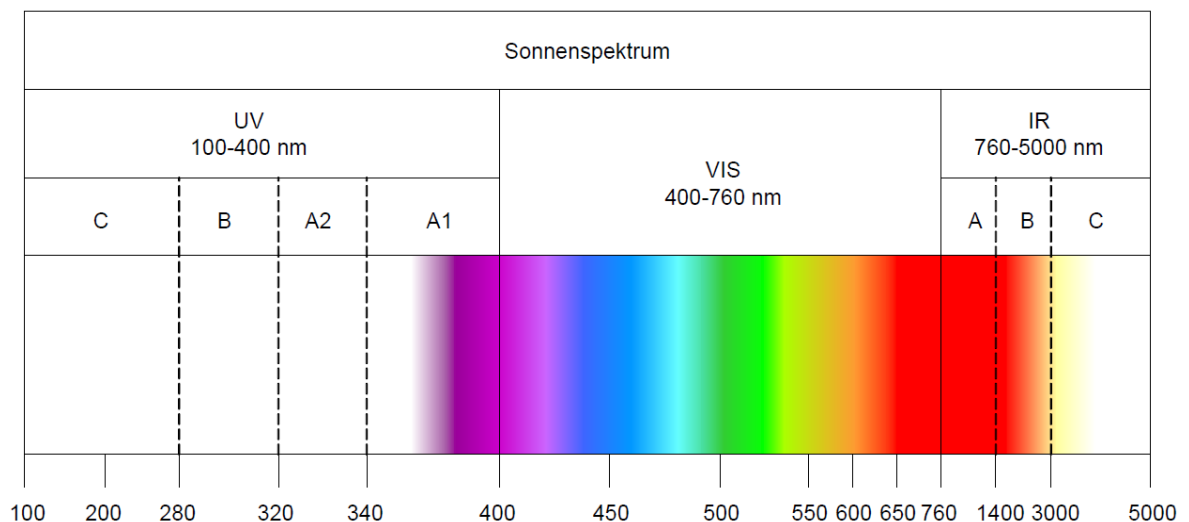


Abbildung 1: Spektralbereiche des Sonnenlichts [BODE, 2004]

UV-Strahlung besitzt die Fähigkeit, in Hautzellen einzudringen und ist dort an einer Vielzahl biologischer Reaktionen beteiligt. Zu den bekanntesten Reaktionen zählen dabei die Sofortpigmentierung der Haut und die Stimulierung der

Melaninsynthese. Eine Überexposition mit UVB-Strahlen führt zu Sonnenbrand, wohingegen UVA-Strahlung Langzeitschäden wie vorzeitige Hautalterung, Hautkrebs und Immunsuppression verursacht, da sie tiefer in die Haut eindringt [SCHRADER, 2001].

Um diesen negativen Einflüssen des Sonnenlichts entgegenzuwirken, sollte man die Haut durch geeignete Sonnenschutzpräparate schützen.

2.1.2 UV-Filter in Sonnenschutzpräparaten

Sonnenschutzpräparate entfalten ihre Schutzwirkung durch die enthaltenen UV-Schutzfilter. Diese können hinsichtlich ihrer Wirkungsweise in chemische und physikalische Filter und, je nach Wirkspektrum, in UVA-, UVB- und Breitbandfilter unterteilt werden.

Physikalische UV-Filter, meist mineralische Pigmente wie Zinkoxid oder Titandioxid, schützen durch Reflexion und Streuung der Strahlung, wohingegen chemische Filter die UV-Strahlung durch konjugierte Doppelbindungen absorbieren [MANG & KRUTMANN, 2003]. Tabelle 1 zeigt Beispiele für chemische UV-Filter im UVA- und UVB-Wirkbereich.

Tabelle 1: Beispiele für chemische UV-Filter
[nach BAG, 2009; MANG & KRUTMANN, 2003; OSTERWALDER et al., 2001]

INCI-Bezeichnung	Chem. Bezeichnung	Markennamen	Eigenschaften
Diethylaminohydroxybenzoylhexylbenzoat	2-[-4-(Diethylamino)-2-hydroxybenzoyl] Benzoessäurehexylester	<ul style="list-style-type: none"> • Uvinul A Plus Granular 	<ul style="list-style-type: none"> • UVA-Filter • öllöslich • photostabil
Butylmethoxydibenzoylmethan	4-tert.-Butyl-4'-methoxydibenzoyl-methan	<ul style="list-style-type: none"> • Eusolex 9020 • Parsol 1789 • Neo Heliopan 357 	<ul style="list-style-type: none"> • UVA-Filter • nicht photostabil (Stabilisierung möglich) • öllöslich
Octocrylen	2-Cyano-3,3-diphenylacrylsäure-2'-ethylhexylester	<ul style="list-style-type: none"> • Escalol 597 • Neo-Heliopan 303 • Uvinul N-539-SG • Parsol 340 • Eusolex OCR 	<ul style="list-style-type: none"> • UVB-Filter • öllöslich
Ethylhexylmethoxycinnamat	2-Ethylhexyl-4-methoxycinnamat	<ul style="list-style-type: none"> • Escalol 557 • Eusolex 2292 • Neo Heliopan AV • Parsol MCX • Uvinul MC 80 	<ul style="list-style-type: none"> • UVB-Filter • öllöslich

Bevor bekannt wurde, dass Langzeitschäden durch UVA-Strahlung entstehen, enthielten Sonnenschutzpräparate hauptsächlich UVB-Filter, was zur Folge hatte, dass die UVA-Exposition verstärkt wurde. Mittlerweile ist die kosmetische Industrie dazu übergegangen, in ihren Produkten vermehrt UVA-Filter einzusetzen. Um einen möglichst großen Wellenlängenbereich abzudecken, werden meist mehrere UV-Filter kombiniert, was allerdings das Risiko von unerwünschten Nebenwirkungen erhöht.

Entscheidend für den Sonnenschutz sind die aktiven Inhaltsstoffe im Präparat, die UVA und UVB unterschiedlich absorbieren. Das Absorptionsspektrum dieser Inhaltsstoffe stellt demnach eine wichtige Größe zur Beschreibung des UV-Schutzes dar, da sich aus diesem erkennen lässt, in welchem Bereich UV-Strahlung absorbiert wird und wie stark die Abschwächung der UV-Strahlung ist [WEBER & SCHULMEISTER, 2011].

Die Aufnahme eines Absorptionsspektrums von Probenverdünnungen ermöglicht eine Aussage über die Absorption im UVA- und im UVB-Bereich, jedoch werden in-vivo-Effekte, wie Penetration in die Haut, nicht berücksichtigt [SAUPE, 2004].

2.1.3 Lichtschutzfaktor

Um Sonnenschutzmittel zu vergleichen und hinsichtlich ihrer Schutzwirkung gegenüber Sonnenbränden (UV-Erythemen) zu beurteilen, wurde der Lichtschutzfaktor (LSF) eingeführt [WEBER & SCHULMEISTER, 2011].

Der auf Sonnenschutzprodukten angegebene Lichtschutzfaktor bezieht sich auf den Schutzeffekt gegen UVB-Strahlen und gibt an, wie viel länger man sich mit geschützter Haut im Vergleich zur ungeschützten Haut in der Sonne aufhalten kann, bis ein Sonnenbrand entsteht. Die Ermittlung des LSF erfolgt in-vivo nach einer standardisierten Prüfvorschrift, die vom Dachverband der europäischen Kosmetikindustrie, der COLIPA, entwickelt wurde. Dazu wird vor und nach dem Auftragen eines Sonnenschutzmittels die minimale Erythemdosis (MED), also die Menge an UVB-Strahlung, bei der ein gerade erkennbares Erythem entsteht, bestimmt [MANG & KRUTMANN, 2003]. Der LSF ergibt sich nach folgender Formel:

$$LSF = \frac{MED \text{ mit Sonnenschutzmittel}}{MED \text{ ohne Sonnenschutzmittel}}.$$

Die MED ist eine individuelle Größe und von Mensch zu Mensch unterschiedlich. Weiterhin ist hervorzuheben, dass sich der LSF auf eine Auftragsmenge von 2 mg/cm² bezieht. Vom Verbraucher wird meist eine deutlich geringere Menge aufgetragen, sodass der effektive LSF kleiner ist, als der angegebene LSF [WEBER & SCHULMEISTER, 2011]. Aus diesem Grund sind Produkte mit einem hohen LSF zu empfehlen. Durch die ständige Entwicklung neuer UV-Filter werden immer häufiger Präparate mit Lichtschutzfaktoren bis zu 100 angeboten, wobei darauf hin-

zuweisen ist, dass die Reduktion der UVB-Strahlungseinwirkung nicht linear mit dem LSF ansteigt. Misst man die Reduktion der UVB-Strahlung, so werden bereits bei LSF 20 rund 95 % absorbiert. Bei einem LSF von 50 erhöht sich die Absorption lediglich auf 98 % [BfR, 2003].

2.1.4 UVA-Schutz

Der LSF ermöglicht die Einordnung der Schutzleistung gegenüber UVB-Strahlung, lässt jedoch keine Rückschlüsse und Aussagen über die UVA-Schutzleistung zu, für deren Bestimmung derzeit noch keine internationalen Standards existieren.

Eine Beurteilung der UVA-Schutzwirkung durch die Erythembildung, die durch UVA-Strahlung induziert wird, ist aus praktischen Gründen nicht geeignet [MANG & KRUTMANN, 2003]. Derzeit werden verschiedene in-vivo und in-vitro-Methoden zur Bestimmung des UVA-Schutzes genutzt.

Die beiden gängigsten in-vivo-Methoden sind Immediate Pigment Darkening (IPD) und Persistent Pigment Darkening (PPD). Bei beiden Methoden wird die Pigmentierung der Haut, die durch UVA-Strahlung ausgelöst wird, gemessen und analog zum LSF ein UVA-Schutzfaktor definiert. Unterschiede liegen in der UVA-Dosis (IPD: 1-6 J/cm²; PPD: 15 J/cm²) und der Zeitdauer, die zwischen Bestrahlung und Messung der Pigmentierung liegen (IPD: 15 min; PPD: mindestens 2 h). Die PPD-Methode hat den Vorteil, dass sie stabilere Ergebnisse liefert, während bei der IPD-Methode der Endpunkt instabil ist [OSTERWALDER et al., 2001]. Laut EU-Kommission sollte der mit der PPD-Methode gemessene Schutzfaktor mindestens ein Drittel des LSF betragen [EU-Kommission, 2006].

Den in-vitro-Methoden ist gemeinsam, dass die UV-Durchlässigkeit des Sonnenschutzmittels, das auf einen UV-durchlässigen Probenträger aufgebracht wurde, gemessen wird.

Die bevorzugt genutzte in-vitro-Methode ist die Bestimmung nach australischem Standard. Dabei wird die Durchlässigkeit von UVA-Strahlung durch mit dem Sonnenschutzmittel beschichtete Quarzplättchen gemessen [WEBER & SCHULMEISTER, 2011]. Nach dieser Methode kann UV-Schutz ausgewiesen werden, wenn der Wert der Transmission im Spektralbereich zwischen 320 und 360 nm überall klei-

ner als 10 % ist, also mindestens 90 % der Strahlung absorbiert wird [BfR, 2003]. Gemessen wird bei einer optischen Schichtdicke von 8 μm oder einer größeren Schichtdicke, wenn die Formulierung entsprechend verdünnt wurde [OSTERWALDER et al., 2001]. Kritisiert wird bei dieser Methode neben der mangelhaften Imitation der Haut vor allem die zumeist inhomogene Verteilung des Produktes auf den Messmedien [SCHRADER, 2001]. Die geforderte Absorption wird nur zwischen 320 und 360 nm erfasst, was das UVA-Filtersystem nur unzureichend charakterisiert. Es werden keine Aussagen über den langwelligen UVA-Bereich und den Zusammenhang zwischen UVA- und UVB-Schutz getroffen [CVUA, 2003]. Ein höherer UVB-Schutz verleitet den Verbraucher zum längeren Aufenthalt in der Sonne, worauf auch der UVA-Schutz abgestimmt sein muss.

Weitere in-vitro-Testmethoden sind die Bestimmung der kritischen Wellenlänge und des UVA/UVB-Verhältnisses, die sich als Kennzahlen aus der Form des Spektrums eines Sonnenschutzmittels ableiten lassen. Zur Bestimmung des UVA/UVB-Verhältnisses werden die Flächen unter dem Extinktionsspektrum im UVA-Bereich und im UVB-Bereich berechnet, mit der Bereichsbreite normiert und durcheinander dividiert [OSTERWALDER et al., 2001]. Die kritische Wellenlänge ist diejenige Wellenlänge, bei der 90 % der Fläche unter der Absorptionskurve im Bereich von 290 bis 400 nm erreicht werden [BfR, 2003]. Gemäß EU-Kommission sollte die kritische Wellenlänge eines Sonnenschutzmittels bei mindestens 370 nm liegen [EU-Kommission, 2006]. Je höher die kritische Wellenlänge ist, desto besser schützt das Produkt vor UVA-Strahlung [WEBER & SCHULMEISTER, 2011]. Sowohl bei der kritischen Wellenlänge als auch beim UVA/UVB-Verhältnis handelt es sich um relative Parameter [HINNEBURG, 2004]. Sie sind somit von der auf das Substrat aufgetragenen Menge, die einem statistischen experimentellen Fehler unterliegt, unabhängig und kaum fehlerbehaftet, was eine gute Reproduzierbarkeit zur Folge hat [OSTERWALDER et al., 2001].

2.1.5 Photostabilität von UV-Filtersubstanzen

Das Bundesamt für Risikobewertung (BfR) kritisiert, dass aufgrund der hohen Lichtschutzfaktoren lange Schutzwirkungen der Produkte angenommen werden. Dies ist aber nur gewährleistet, wenn die UV-Schutzfilter über die Schutzzeit stabil bleiben bzw. ihre Metabolite eine vergleichende Schutzwirkung haben [BfR, 2003].

Die Photostabilität ist entscheidend für die Effizienz und die Sicherheit der UV-Filter, findet aber in den gängigen in-vitro-Methoden keine oder nur unzureichende Beachtung [OSTERWALDER et al., 2001].

Zur Überprüfung der Photostabilität wird häufig eine von der COLIPA vorgeschlagene Methode genutzt. Bei dieser werden die gelösten UV-Filter auf eine Glasoberfläche aufgebracht, getrocknet, bestrahlt und anschließend die Wiederfindung der aufgetragenen Menge an UV-Filter mittels HPLC analytisch bestimmt [BfR, 2003]. Diese chemische Analyse gibt zwar Aufschluss über die Photostabilität einzelner Filter, ermöglicht aber keine Rückschlüsse auf die verbliebene Schutzwirkung [OSTERWALDER et al., 2001]. Für die in-vitro-Untersuchung der verbleibenden Schutzwirkung wird die aufgebrachte Probe mit UV-Licht bestrahlt und anschließend das Absorptionsspektrum im Vergleich zur unbestrahlten Probe aufgenommen, sodass mögliche Differenzen in der Schutzleistung sichtbar werden.

2.2 Photosensibilisierung

Unter Photosensibilisierung versteht man einen Prozess, bei dem durch eine spezifische Substanz, dem sogenannten Photosensibilisator, sowie der Einwirkung von normalerweise unwirksamen Strahlendosen Empfindlichkeitsreaktionen der Haut hervorgerufen werden [SPIELMANN et al., 2000].

Die Grundvoraussetzung hierfür stellt dabei die Fähigkeit des Stoffs dar, auftreffendes, energiereiches UV-Licht zu absorbieren und sich dadurch chemisch zu verändern [UMBACH, 2004].

Am häufigsten werden Photosensibilisierungsreaktionen durch UVA-Strahlung hervorgerufen, gefolgt vom sichtbaren Licht und der UVB-Strahlung [SOJKA, 2005].

Die Verwendung des Begriffs der Phototoxizität zur Beschreibung von Hautreaktionen, die durch das Zusammenspiel von Photosensibilisator und Strahlung hervorgerufen werden, beinhaltet sowohl phototoxische als auch photoallergische Reaktionen. Unter Phototoxizität versteht man eine zellschädigende Reaktion, die nach erstmaliger Verabreichung einer bestimmten Chemikalie auf die Haut sowie anschließender Einwirkung von UV-Strahlung erfolgt. Die Photoirritation stellt dabei eine Sonderform der Phototoxizität dar, da sie nur akut toxische Reaktionen

beschreibt, die bereits 0 – 72 Stunden nach der Strahlungseinwirkung auftreten. Die Photoallergie hingegen ist eine immunologische Reaktion, die eine Induktionszeit von ein bis zwei Wochen nach erstmaliger Verabreichung der Chemikalie und UV-Licht-Einwirkung benötigt und sich erst nach wiederholtem Kontakt mit dem Photosensibilisator und der Licht-Exposition zeigt [SPIELMANN et al., 2000].

Photosensibilisierende Eigenschaften von Stoffen können sowohl in-vivo als auch in-vitro ermittelt werden. Eine mögliche in-vitro-Methode stellt der Red-blood-cell-Phototoxizitätstest dar. Dieser erlaubt durch den Nachweis von Membranschädigungen Aussagen über phototoxische Eigenschaften eines Stoffes zu treffen. Dazu wird die phototoxisch induzierte Hämolyse von Erythrozyten quantitativ bestimmt. Das membranschädigende Potenzial von chemischen Substanzen wird im Red-blood-cell-Test durch die Inkubation dieser Substanzen zusammen mit Erythrozyten ermittelt [PAPE, 1992]. Der RBC-Photohämolysetest stellt eine Erweiterung des RBC-Tests dar, bei der die Erythrozyten zusätzlich UV-Strahlung ausgesetzt werden.

2.3 Erythrozyten

Die Erythrozyten (rote Blutkörperchen / red blood cells) zählen zu den zellulären Bestandteilen des Blutes und entsprechen mit einem Volumenanteil von 44 % fast der Hälfte des Gesamtblutes [LINß & FANGHÄNEL, 1998].

Die Hauptaufgabe von Erythrozyten besteht im Transport von Gasen, vorrangig von Sauerstoff. In ihrer Normalform treten sie als flexible, flache Scheibchen mit einem Durchmesser von etwa 7,5 µm und einem aufgetriebenen Rand auf, siehe Abbildung 2. Diese Form bietet eine große Oberfläche und gleichzeitig kurze Diffusionsstrecken für die Sauerstoffmoleküle zum Hämoglobin.

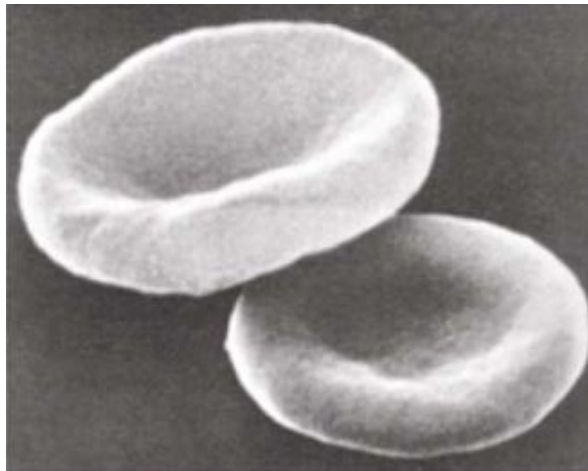


Abbildung 2: Erythrozyten in ihrer Normalform als bikonkave Scheiben [LANG & LANG, 2007]

2.3.1 Erythrozytenmembran

Bei der Erythrozytenmembran handelt es sich um eine semipermeable Membran mit einem Membranpotenzial von -10 mV. Integrale Proteine, wie z.B. die Na^+/K^+ -ATPase, tragen maßgeblich zur Struktur und Stabilität der Membran bei [SINGER & NICOLSON, 1972] und ermöglichen die Aufrechterhaltung des Membranpotenzials. Die Na^+/K^+ -ATPase hält die intrazelluläre Natrium-Ionenkonzentration niedrig und die Kalium-Ionenkonzentration hoch. Durch chemische Vorgänge kann jedoch die Permeabilität der Membran für Natrium-Ionen gesteigert sein. Der daraus resultierende Einstrom von Natrium-Ionen kann durch die Na^+/K^+ -ATPase nicht mehr kompensiert werden. Eine Zunahme der Natrium-Ionenkonzentration in den Zellen depolarisiert diese und führt zum Einstromen von Chlorid-Ionen und Wasser, wodurch es zur Zellschwellung kommt [LANG & LANG, 2007]. Wenn kein weiteres Wasser aufgenommen werden kann, kommt es zur Hämolyse.

2.3.2 Hämoglobin

Die rote Farbe der Erythrozyten wird durch das enthaltene Hämoglobin verursacht, dessen Anteil einem Drittel des Erythrozytengewichts entspricht [LANG & LANG, 2007]. Hämoglobin ermöglicht die Hauptaufgabe der Erythrozyten, den Sauerstofftransport, da es in der Lage ist, Sauerstoffmoleküle reversibel zu binden.

Ein Hämoglobinmolekül besteht aus vier Untereinheiten mit jeweils einer Proteinkette (Globin) und einem eisenhaltigen Porphyrinring (Häm), der Bindungsstelle für die Sauerstoffmoleküle, siehe Abbildung 3.



Abbildung 3: Hämoglobin (PDB:1GZX), vier Untereinheiten (Bändermodell) mit prosthetischer Gruppe Häm (Stäbchenmodell, grau)

Durch seine rote Färbung ist Hämoglobin in wässrigen Lösungen photometrisch nachweisbar und quantifizierbar, siehe Abbildung 4.

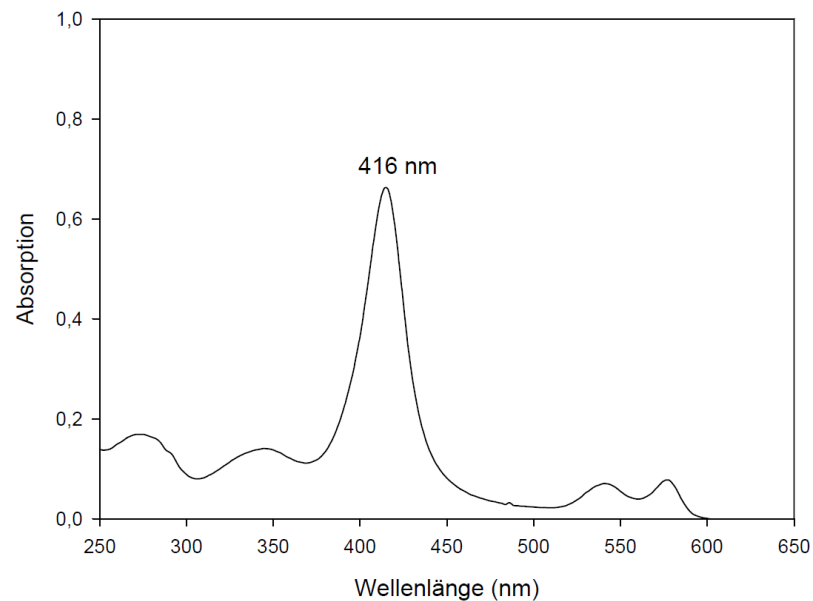


Abbildung 4: Absorptionsspektrum von Hämoglobin mit intensivstem Absorptionsmaximum bei 416 nm [Bode, 2004]

2.3.3 Hämolysse

Unter Hämolysse versteht man die Zerstörung der roten Blutkörperchen, wodurch das Hämoglobin sowie weitere Bestandteile aus den Erythrozyten in das umgebende Medium abgegeben werden, erkennbar an der Rotfärbung des Mediums. Es existieren verschiedene Arten der Hämolysse, die sich in ihren Ursachen und Wirkungsweisen unterscheiden. Dazu zählen die mechanische und die osmotische Hämolysse sowie die Membranhämolysse [HÄNSEL & STICHER, 2010].

Unter mechanischer Hämolysse versteht man jene Hämolysse, die zum Abbau von Erythrozyten im gesunden Organismus dient. Erythrozyten haben nur eine begrenzte Lebensdauer von etwa 100 bis 120 Tagen [LANG & LANG, 2007], danach erfolgt aufgrund der mechanischen Beanspruchung durch das Zirkulieren in den Gefäßen die Hämolysse.

Die osmotische Hämolysse kann beim Ausgleich von intra- und extrazellulären Konzentrationsunterschieden erfolgen. Ist die Ionenkonzentration in den Erythrozyten höher als im umgebenden Medium, strömt vermehrt Wasser in die Zellen, was schließlich zum Platzen der Erythrozyten führt [HÄNSEL & STICHER, 2010].

Die Membranhämolyse ist eine Folge der Einwirkung stofflicher Faktoren. Organische Lösungsmittel sind beispielsweise in der Lage, die Lipidanteile in der Membran herauszulösen, wodurch die Membran instabil wird und eine Hämolyse möglich ist. Die hämolytische Wirksamkeit von Seifen und synthetischen Waschmitteln beruht auf der Herabsetzung der Oberflächenspannung zwischen der wässrigen Phase und der Lipidphase der Membran. Die Lipide werden emulgiert und aus der Membran herausgelöst, wodurch es zu Membranlücken und somit zur Hämolyse der Zellen kommt [SCHMIDT & LANG, 2007].

Trotz der unterschiedlichen Ursachen ist ein Zusammenwirken der einzelnen Hämolysearten möglich, so kann beispielsweise eine beginnende Membranhämolyse eine osmotische Hämolyse zur Folge haben.

2.4 Photohämolyse von Erythrozyten

Erythrozyten stellen ein gut geeignetes Modell zur Bestimmung von Zellmembranschädigungen dar, die aufgrund von UV-Strahlung hervorgerufen werden, da ihre Biomembran einen Angriffsort für photochemische Prozesse darstellen kann. Da Erythrozyten keinen Zellkern besitzen [KEMPE, 2007], ist eine Auflösung der Membran durch DNA-Schäden ausgeschlossen.

Nachdem die Erythrozyten mit UV-Licht Kontakt hatten, kommt es zur Auflösung der Membran und damit zum Freisetzen von Hämoglobin aus dem Zellinneren. Das freigesetzte Hämoglobin kann anschließend photometrisch quantifiziert werden.

Es wird vermutet, dass die UV-Filter in den Sonnenschutzpräparaten durch die UV-Bestrahlung Abbauprodukte erzeugen, von denen das Penetrationsverhalten und die Toxizitätswirkung nicht bekannt ist, wodurch es zu Hautreaktionen kommen kann [SCHRADER, 2001].

In Abbildung 5 ist das Prinzip der Photohämolyse eines Erythrozyten schematisch dargestellt. Nachdem die Erythrozyten mit einem Photosensibilisatormolekül (P) in Kontakt gekommen sind, werden diese mit UV-Licht bestrahlt. Daraufhin löst der Photosensibilisator einige Lipidanteile aus der Membran, wodurch eine Perforation in der Membran entsteht. Dadurch ist es den Natrium-Ionen (Na^+) aus der Zelum-

gebung möglich, in die Zelle zu strömen. Gleichzeitig werden Kalium-Ionen (K^+) an die Umgebung abgegeben. Aufgrund der nun höheren Natrium-Ionen-Konzentration im Inneren des Erythrozyten strömt vermehrt Wasser in die Zelle. Dadurch wird die Zellmembran immer weiter gedehnt, bis sie schließlich platzt und das intrazelluläre Hämoglobin freigesetzt wird. Nach Abzentrifugieren der Membranbestandteile kann das lösliche Hämoglobin im Überstand photometrisch ermittelt werden [Bode, 2004]. Die Menge an ausgetretenem Hämoglobin ist dabei ein Maß für die membranschädigende Wirkung des Photosensibilisators unter UV-Bestrahlung.

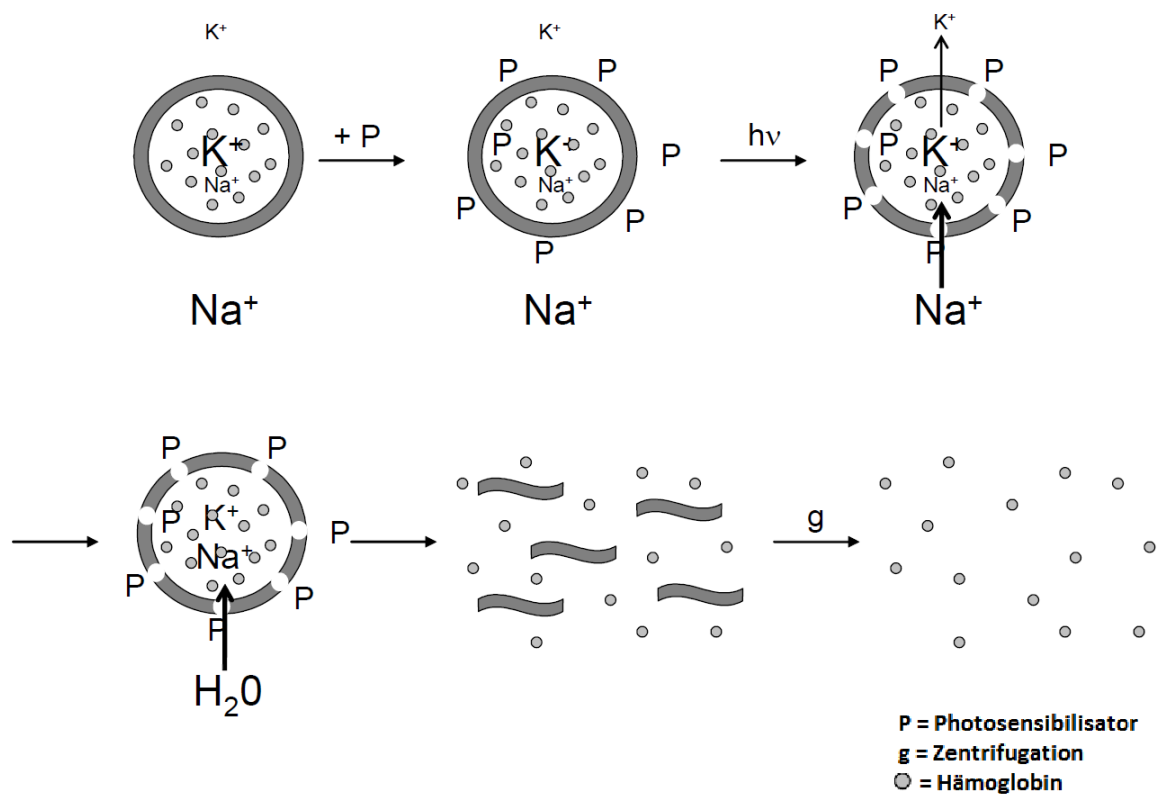


Abbildung 5: Photohämolyse eines Erythrozyten, schematische Darstellung [nach BODE, 2004]

3 Material

3.1 Chemikalien

- Citratpuffer:
 - 66 mmol/l Trinatriumcitratdihydrat (Fluka)
 - 44 mmol/l Citronensäure (Fluka)
 - 1000 ml Aqua dest.
- PBS-Puffer:
 - 22 mmol/l Dinatriumhydrogenphosphat (Fluka)
 - 5,6 mmol/l Kaliumdihydrogenphosphat (Fluka)
 - 123,3 mmol/l Natriumchlorid (Merck)
 - 10 mmol/l Glucose (Roth)
 - 1000 ml Aqua dest.
- Natriumlaurylsulfat (SDS; Roth)
- Ethanol, absolut (Merck)
- Schweineblut, frisch

3.2 Geräte

- Zentrifuge T23 (MLW)
- Tischzentrifuge Centrifuge 5415C (Eppendorf)
- Multiplattenreader htII (Anthos Mikrosysteme)
- Waage AG 204 Delta Range (Mettler Toledo)
- UV-Lampe (Wepa Apothekenbedarf)
 - Kurzwelle (254 nm): 6 W UV-Leuchtmittel G6T5 (Germicidal Lamps);
Bestrahlungsstärke 17,7 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ bei 1 m Abstand
 - Langwelle (366 nm): 6 W UV-Leuchtmittel Blacklight F6T5BL (Eiko)
- Mikroskop (Carl Zeiss Jena)
- Zählkammer Fuchs-Rosenthal (Marienfeld-Superior)
- UV-Spektrometer Specord 50 (Analytik Jena)
- Spektralphotometer Helios Beta (Unicam)
- Reagenzglasschüttler Lab Dancer (IKA)
- Ultraschallbad Sonorex RK 31 (Bandelin electronic)

4 Methoden und Ergebnisse

4.1 Photometrische Untersuchungen

Zur Überprüfung der UV-Schutzwirkung sollten die Absorptions- und Transmissionsspektren der Sonnenschutzmittel in Lösungen aufgenommen werden. Ethanol und Olivenöl sollten auf ihre Eignung als Lösungsmittel für diesen Versuch untersucht werden. In einem Vorversuch konnte ermittelt werden, dass sich beide Substanzen als Lösungsmittel eignen, wenn eine zusätzliche Behandlung im Ultraschallbad erfolgt. Eine luftblasenfreie Messung in Küvetten kann jedoch mit Olivenöl als Lösungsmittel nicht garantiert werden, sodass Ethanol als Lösungsmittel für weitere Versuche gewählt wurde. Bei diesem Testsystem werden nur die in Ethanol löslichen UV-Filter erfasst.

4.1.1 Bestimmung des linearen Messbereichs

Um zu gewährleisten, dass die Absorptionswerte der Lösungen in den gewählten Konzentrationen korrekt gemessen werden, musste die Linearität des Messbereichs nachgewiesen werden. Dazu wurden die Probenlösungen in verschiedenen Konzentrationen photometrisch vermessen. Die Abhängigkeit der Absorption von der Probenkonzentration wurde auf Linearität untersucht.

4.1.1.1 Methode

Je 250 mg der Sonnenschutzcremes LSF 6 und LSF 50 wurden in ein Kunststoffröhrchen mit Schraubverschluss eingewogen, mit 4 ml Ethanol versetzt und auf dem Reagenzglasschüttler behandelt, bis die Substanzen fein verteilt im Lösungsmittel vorlagen. Die so hergestellten Suspensionen wurden in 25 ml Maßkolben überführt und bis zur Markierung mit Ethanol aufgefüllt. Zur Verbesserung der Löslichkeit wurden die Probenlösungen 4 h im Ultraschallbad behandelt. Die Mindestbehandlungsdauer im Ultraschallbad wurde in einem Vorversuch durch visuelle Kontrolle der Löslichkeit nach verschiedenen Behandlungsdauern ermittelt.

Nach ausreichender Homogenisierung wurden ungelöste Inhaltsstoffe mit Hilfe eines Faltenfilters abfiltriert, damit diese das Ergebnis nicht beeinflussen. Aus den Filtraten wurden Verdünnungen mit Ethanol hergestellt (Tabelle 2).

Tabelle 2: Verdünnungsstufen

Verdünnungsstufe	Probenkonzentration [mg/ml]
1:100	0,100
1:200	0,050
1:300	0,033
1:400	0,025
1:500	0,020

Für jede Lösung wurden das Absorptions- und das Transmissionsspektrum im Wellenlängenbereich zwischen 290 und 400 nm gegen das Lösungsmittel Ethanol aufgenommen. Die Messungen erfolgten jeweils als Doppelbestimmung.

4.1.1.2 Ergebnisse

Abbildung 6 zeigt den Vergleich der Absorptionsspektren von Sonnenschutzcreme mit LSF 6 und LSF 50 für die Probenkonzentration von 0,1 mg/ml.

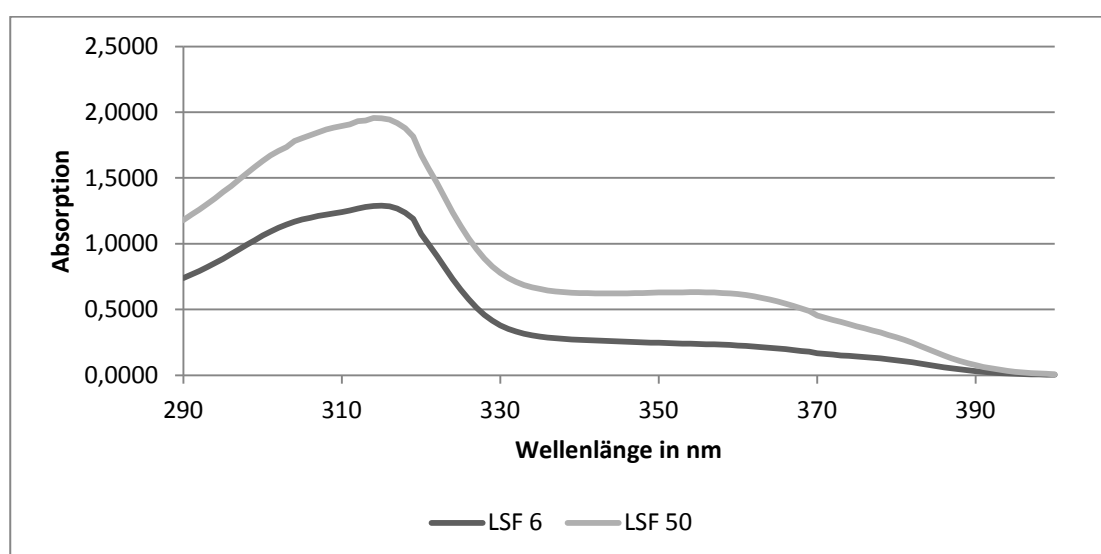


Abbildung 6: Absorptionsspektren von Sonnenschutzcreme LSF 6 und LSF 50

Im UVB-Bereich (290 – 320 nm) liegen die Absorptionsmaxima sämtlicher Konzentrationen bei einer Wellenlänge von 315 nm. Im UVA-Bereich lagen die Absorptionsmaxima bei 355 nm. Die Abbildungen 7 und 8 zeigen die Abhängigkeit der Absorption von der Konzentration der beiden Sonnenschutzcremes sowie die Regressionsgeraden und das Bestimmtheitsmaß (R^2).

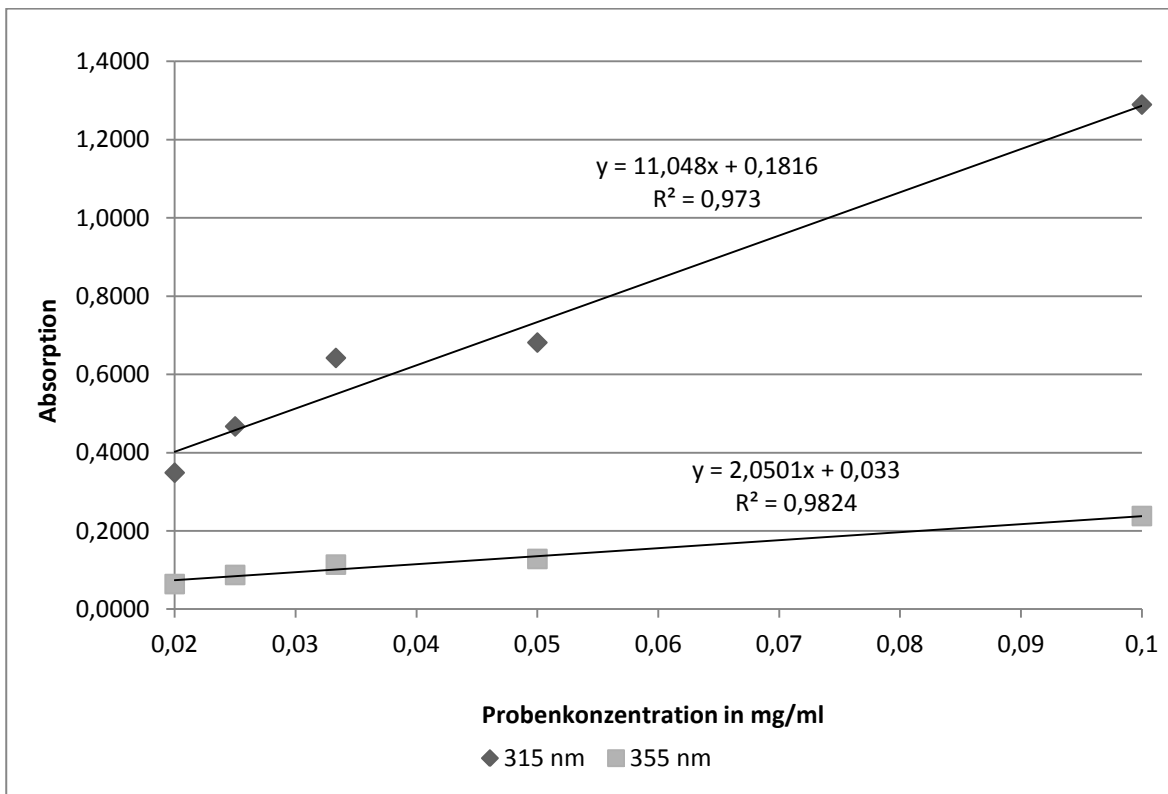


Abbildung 7: Abhängigkeit der Absorption von der Konzentration (LSF 6)

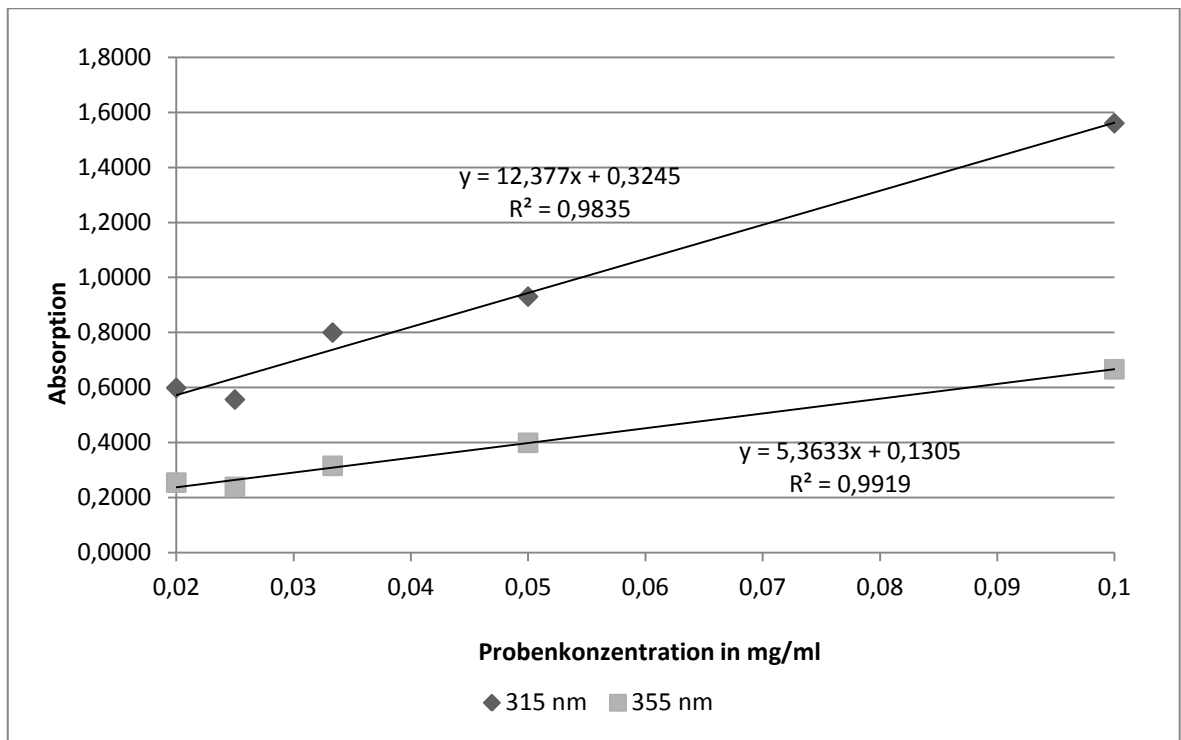


Abbildung 8: Abhängigkeit der Absorption von der Konzentration (LSF 50)

Sowohl im UVB- als auch im UVA-Bereich ergibt sich für beide Sonnenschutzcremes ein linearer Zusammenhang zwischen den gemessenen Absorptionswerten und den vermessenen Konzentrationen. Die ermittelten Bestimmtheitsmaße sind stets größer als 0,97.

4.1.2 Absorptionsmessungen für Sonnenschutzcreme

Die beiden Sonnenschutzcremes mit LSF 6 und LSF 50 sollten in verschiedenen Kombinationen auf ihre Absorptionseigenschaften untersucht werden. Für den Versuch wurden die Kombinationen durch separates Einwiegen jeder Creme hergestellt.

Es soll überprüft werden, ob das eingesetzte in-vitro-Testsystem für orientierende und vergleichende Analysen der Lichtschutzwirkungen verschiedener Lichtschutzfaktoren geeignet ist.

4.1.2.1 Methode

Für die UV-spektroskopische Untersuchung unterschiedlicher Kombinationen der beiden Sonnenschutzcremes (LSF 6 und LSF 50) wurden jeweils 250 mg Sub-

stanz (vgl. Probenzusammensetzungen Tabelle 3) in ein Kunststoffröhrchen mit Schraubdeckelverschluss eingewogen.

Tabelle 3: Probenzusammensetzungen

Bezeichnung	Einwaage [mg] LSF 6 / LSF 50
100 % LSF 6 / 0 % LSF 50	250 / 0
80 % LSF 6 / 20 % LSF 50	200 / 50
60 % LSF 6 / 40 % LSF 50	150 / 100
50 % LSF 6 / 50 % LSF 50	125 / 125
40 % LSF 6 / 60 % LSF 50	100 / 150
20 % LSF 6 / 80 % LSF 50	50 / 200
0 % LSF 6 / 100 % LSF 50	0 / 250

Die Lösungen wurden analog zu Punkt 4.1.1.1 behandelt und im Verhältnis 1:100 mit Ethanol verdünnt.

Für jede Lösung wurden das Absorptions- und das Transmissionsspektrum im Wellenlängenbereich zwischen 290 und 420 nm gegen Ethanol aufgenommen. Die Messungen erfolgten jeweils als Doppelbestimmung.

4.1.2.2 Ergebnisse

Abbildung 9 zeigt beispielhaft den Verlauf des Transmissionsspektrums der Probe „50 % LSF 6 / 50 % LSF 50“. Abbildung 10 zeigt das Absorptionsspektrum. Die Spektren der weiteren Probenzusammensetzungen ähneln den dargestellten Verläufen. Unterschiede liegen in den ermittelten Absorptionswerten.

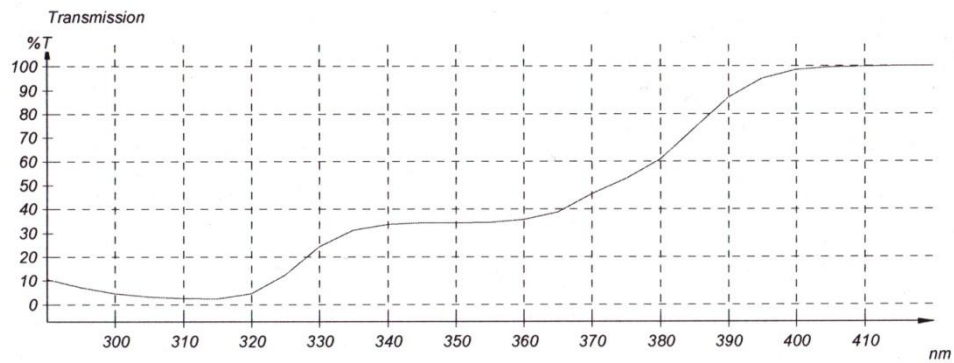


Abbildung 9: Transmissionsspektrum für Probe "50 % LSF 6 / 50 % LSF 50"

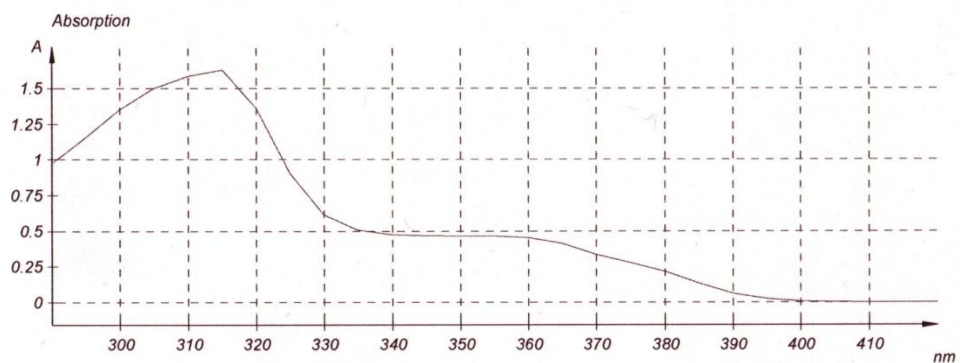


Abbildung 10: Absorptionsspektrum für Probe "50 % LSF 6 / 50 % LSF 50"

Im UVB-Bereich liegen die Absorptionsmaxima sämtlicher Proben bei einer Wellenlänge von 315 nm. Im UVA-Bereich wurden die Absorptionswerte bei 355 nm abgelesen. Abbildung 11 zeigt die grafische Darstellung der Absorptionen in Abhängigkeit des Anteils von der Sonnenschutzcreme mit LSF 50 in der Probe.

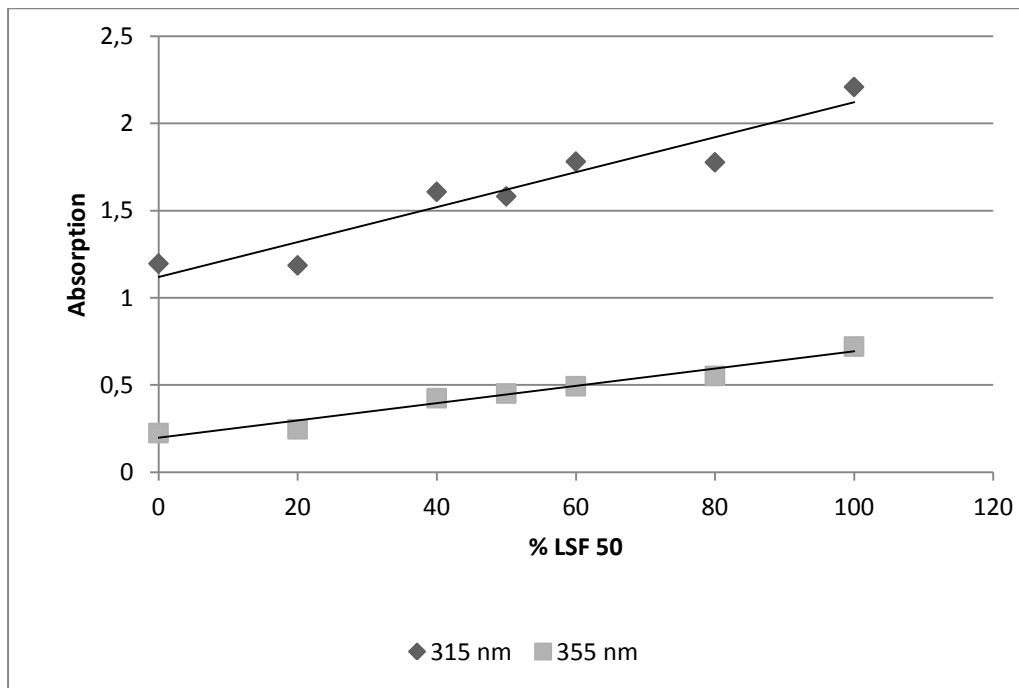


Abbildung 11: Absorptionen in Abhängigkeit vom Anteil der Sonnenschutzcreme mit LSF 50 in der Probenzusammensetzung

Laut Zusammensetzung enthält die Sonnenschutzcreme mit LSF 50 1,5 x so viel UV-Filter wie die Sonnenschutzcreme LSF 6. Aus den Ergebnissen ist eine Zunahme der Absorptionen im UVA- und UVB-Bereich bei steigendem Anteil an Sonnenschutzcreme mit LSF 50 erkennbar. Mit der angewandten in-vitro-Methode sind vergleichende Untersuchungen zu den Absorptionseigenschaften von Sonnenschutzcremes mit verschiedenen Lichtschutzfaktoren möglich. Die höhere UV-Schutzwirkung bei höherem LSF spiegelt sich in den gemessenen höheren Absorptionen der in Ethanol gelösten Sonnenschutzpräparate wider.

Aus den Flächeninhalten unter den Absorptionsspektren im jeweiligen Wellenlängenbereich können die kritische Wellenlänge und das UVA/UVB-Verhältnis näherungsweise berechnet werden. Somit ist eine Abschätzung über den Anteil an UVA-Schutz bei unterschiedlichen Lichtschutzfaktoren möglich. Ein angemessener UVA-Schutz soll ein Drittel des UVB-Schutzes betragen [EU-Kommission, 2006].

4.1.3 Überprüfung der Photostabilität

Um die Photostabilität der Sonnenschutzpräparate sowie die verbleibende Schutzleistung nach UV-Bestrahlung zu ermitteln, wurden Absorptions- und Transmissionsmessungen von UV-bestrahlten und unbestrahlten Proben durchgeführt. Der Versuch wurde mit den Sonnenschutzcremes (LSF 6 und LSF 50) sowie der Kombination „50 % LSF 6 / 50 % LSF 50“ durchgeführt. Da ein extern durchgeführter Versuch zur UV-Schutzleistung der Produkte für die Sonnenschutzcreme mit LSF 50 einen zu geringen UVA-Schutz nachwies, wurden weitere Proben mit anderer Zusammensetzung für den LSF 50 (vgl. Tabelle 4) vermessen.

4.1.3.1 Methode

Jeweils 250 mg Substanz (vgl. Tabelle 4) wurden in ein Kunststoffröhrchen mit Schraubdeckelverschluss eingewogen und mit 4 ml Ethanol versetzt.

Tabelle 4: Eingesetzte Proben für den Photostabilitätstest

Bezeichnung	Bemerkung
LSF 6	–
50 % LSF 6 / 50 % LSF 50	Es wurden je 125 mg der Sonnenschutzcremes LSF 6 und LSF 50 eingewogen
LSF 50 (UVA-Filter 1)	–
LSF 50 ohne Tiandioxid (UVA-Filter 1)	Titandioxid ist ein anorganischer Breitbandfilter; es wird vermutet, dass der UVA-Filter 1 an Tiandioxid adsorbiert und somit schwer zu detektieren ist; zur Überprüfung dieser Hypothese wurde Tiandioxid in dieser Formulierung nicht verwendet
LSF 50 UVA-Filter 2	Einsatz eines anderen UVA-Filters in der Formulierung; dieser soll besonders im langwelligen UVA-Bereich wirksam und außerdem sehr photostabil sein

Die Proben wurden mit Hilfe eines Reagenzglasschüttlers in Ethanol suspendiert, bis die Substanzen fein verteilt im Lösungsmittel vorlagen. Die Lösungen wurden in einen 25 ml Maßkolben überführt, mit Ethanol bis zur Marke aufgefüllt und zur

Verbesserung der Löslichkeit 4 h im Ultraschallbad behandelt. Ungelöste Inhaltsstoffe wurden mittels Faltenfilter abfiltriert.

Es wurden 5 ml jeder Lösung in eine Mikrotiterplatte (6 Kavitäten, Oberflächen-Volumen-Verhältnis ca. 2:1) überführt und auf einem Schüttler 5 h UV-Strahlung ausgesetzt. Die bestrahlten Lösungen wurden in einen 5 ml Maßkolben überführt. Der Verdunstungsverlust des Ethanols wurde ausgeglichen, indem bis zur Markierung mit Ethanol aufgefüllt wurde. Sowohl die bestrahlten als auch die unbestrahlten Probelösungen wurden im Verhältnis 1:100 mit Ethanol verdünnt.

Für jede Lösung wurde das Absorptions- und das Transmissionsspektrum im Wellenlängenbereich zwischen 290 und 420 nm gegen Ethanol aufgenommen. Die Messungen erfolgten jeweils als Doppelbestimmung.

4.1.3.2 Ergebnisse

In den Abbildungen 12 und 13 sind die Ergebnisse des Photostabilitätstests grafisch aufgetragen. Sowohl im UVA- als auch im UVB-Bereich kommt es zu einer Verringerung der Absorptionen nach der Bestrahlung mit UV-Licht. Die Probe „LSF 50 ohne Titandioxid“ zeigt nur geringfügig bessere Absorptionswerte im UVA-Bereich. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass Titandioxid keinen wesentlichen Einfluss auf den Nachweis des UVA-Filters 1 hat. Entgegen der Erwartungen erzielt der UVA-Filter 2 keine deutlich höheren Absorptionswerte als der UVA-Filter 1.

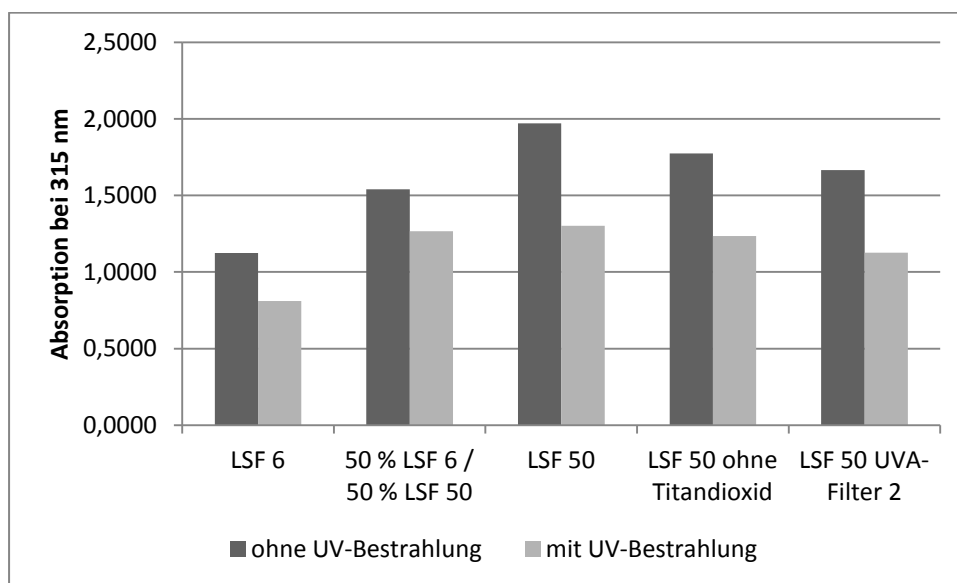


Abbildung 12: Vergleich der Absorptionen im UVB-Bereich mit und ohne UV-Bestrahlung

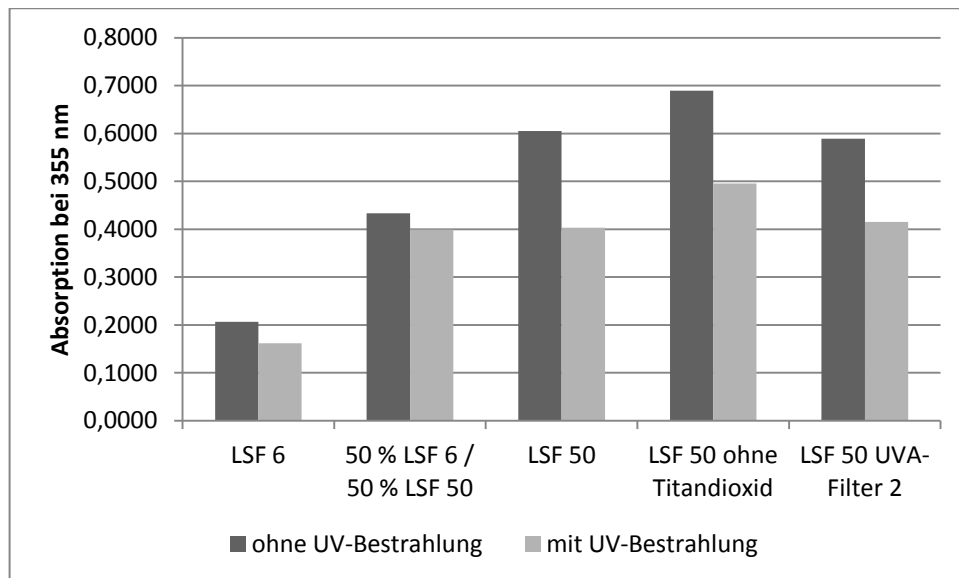


Abbildung 13: Vergleich der Absorptionen im UVA-Bereich mit und ohne UV-Bestrahlung

Alle Proben besitzen mindestens noch 65 % ihrer Schutzleistung nach fünfstündiger Bestrahlung mit UV-Licht. Die größte verbleibende Schutzwirkung wurde bei der Kombination aus LSF 6 und LSF 50 ermittelt.

4.2 RBC-Test

4.2.1 Herstellung der Pufferlösungen

Für den RBC-Photohämolysetest wird ein Citratpuffer verwendet, der die Gerinnung des Blutes verhindern soll. Das Citratanion bildet einen Komplex mit Calcium, ein essenzieller Cofaktor für eine Vielzahl von Gerinnungsfaktoren [TASKAYA, 2011]. Durch die so erzielte Senkung des ionisierten Calciumwertes kann die Gerinnungskaskade nicht mehr ablaufen [BRETT, 2010]. Es wurden 19,4106 g Trinatriumcitratdihydrat und 8,4537 g Citronensäure in 1000 ml Aqua dest. gelöst und anschließend autoklaviert.

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) wird für die Herstellung der RBC-Suspension sowie für Verdünnungs- und Waschvorgänge benötigt. Für den PBS-Puffer wurden 3,1515 g Dinatriumhydrogenphosphat, 0,7621 g Kaliumdihydrogenphosphat, 7,2057 g Natriumchlorid und 1,8017 g Glucose in 1000 ml Aqua dest. gelöst. Der pH-Wert des Puffers von 7,2 trägt zur Aufrechterhaltung der Zell-

lebensfähigkeit bei. Vor der Verwendung wird der PBS-Puffer mittels eines Spritzenvorsatzfilters mit einer Porengröße von 0,2 µm steril filtriert.

Beide Puffer werden nach der Herstellung bei 2 – 8 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

4.2.2 Herstellung der RBC-Suspension

Das für den RBC-Photohämolysetest benötigte Blut stammte von frisch geschlachteten Schweinen. Zur Gerinnungshemmung wurden jeweils 450 ml Blut mit 50 ml Citratpuffer versetzt und anschließend im Kühlschrank bei 2 – 8 °C aufbewahrt.

Für die Herstellung der RBC-Suspension wurden je 25 ml mit Citratpuffer versetztes Schweineblut in zwei 50 ml Kunststoffröhrchen überführt und 10 min bei 570 x g zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde verworfen und das Pellet in 20 ml PBS-Puffer resuspendiert. Dieser Waschvorgang aus Zentrifugieren und Resuspendieren wurde wiederholt, bis der Überstand klar war, siehe Abbildung 14. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 15 ml PBS-Puffer resuspendiert. Der Inhalt beider Röhrchen wurde vereinigt. Die so hergestellte Suspension wurde bei 2 – 8 °C im Kühlschrank aufbewahrt und maximal 3 Tage verwendet. Um freigesetztes Hämoglobin aus der Suspension zu entfernen, wurde diese vor jeder Verwendung erneut zentrifugiert, mit PBS-Puffer gewaschen und das entstandene Pellet in PBS-Puffer resuspendiert.

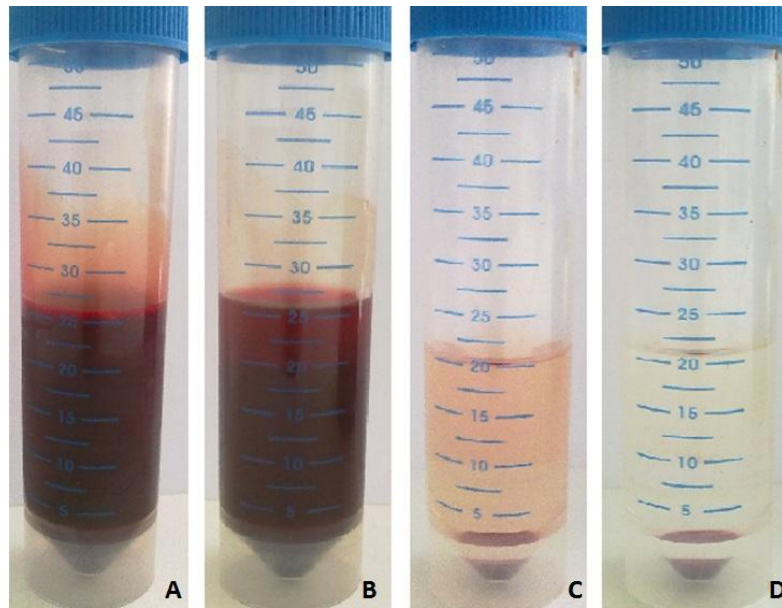


Abbildung 14: Herstellen der RBC-Suspension

A: mit Citratpuffer versetztes Blut; B: Blut nach dem Zentrifugieren; C: RBC-Suspension nach dem ersten Waschvorgang; D: RBC-Suspension nach dem zweiten Waschvorgang

Um eine gleichbleibende Zellzahl der hergestellten RBC-Suspension zu gewährleisten, wurde diese vor jeder Verwendung mittels Zählkammer ermittelt. Die Zelldichte sollte bei mindestens 1×10^8 Zellen/ml liegen [SOJKA, 2005].

4.2.3 Aufnahme des Absorptionsspektrums von Hämoglobin

Die Messwerte im RBC-Photohämolysetest werden durch die Bestimmung der Absorption einer Hämoglobinlösung bei einer geeigneten Wellenlänge ermittelt. Für die Bestimmung des Absorptionsmaximums des Hämoglobins wurde ein Spektrum über einen Wellenlängenbereich von 300 – 850 nm aufgenommen. Die Messungen dienten zudem dazu, die am besten geeignete Methode zur Erzielung einer Totalhämolyse zu ermitteln. Mit Aqua dest. soll eine osmotische Hämolyse ausgelöst werden, wohingegen durch das Tensid Natriumlaurylsulfat (SDS) eine Hämolyse aufgrund von Membranschädigungen erzielt werden soll. Eine mögliche mechanische Hämolyse soll durch Einfrieren und Auftauen der Erythrozyten bzw. starkes Zentrifugieren überprüft werden. Die verschiedenen Methoden wurden jeweils mit und ohne UV-Bestrahlung durchgeführt, um zu ermitteln, ob UV-Licht eine Umwandlung des Hämoglobins in Methämoglobin verursacht, dessen Absorptionsmaximum bei 630 nm liegt [SOJKA, 2005]. Die Anwesenheit von Met-

Hämoglobin könnte zu einer Verfälschung der Ergebnisse der photometrischen Messungen führen.

4.2.3.1 Methode

Für die Ermittlung des Absorptionsspektrums von Hämoglobin aus Erythrozyten in verschiedenen Testansätzen wurde die RBC-Suspension nach der Beschreibung im Punkt 4.2.2 hergestellt.

Folgende Testlösungen (vgl. Tabelle 5), die auf ihre Fähigkeit zur Totalhämolysen der Erythrozyten untersucht werden sollen, wurden jeweils zweimal in 1,5 ml Reaktionsgefäßen hergestellt:

Tabelle 5: Testlösungen für Totalhämolysen

1	Aqua dest.:	25 µl RBC-Suspension	975 µl Aqua dest.
2	SDS:	25 µl RBC-Suspension	975 µl SDS-Lösung (c=50 mg/ml)
3	Gefrieren:	25 µl RBC-Suspension	975 µl PBS
4	Zentrifugieren:	25 µl RBC-Suspension	975 µl PBS

Lösung 3 wurde bereits am Tag zuvor hergestellt und über Nacht tiefgefroren. Lösung 4 wurde nach der Herstellung für 30 min bei 16000 x g zentrifugiert.

Anschließend wurde ein Lösungsansatz jeder Testlösung 60 min UV-Strahlung ausgesetzt. Der zweite Lösungsansatz wurde 60 min im Dunkeln belassen. Nach einer Standzeit aller Proben von 30 min im Dunkeln wurden die Proben 10 min bei 570 x g zentrifugiert.

Von den Überständen wurde mit dem UV-Spektrometer Specord 50 das Absorptionsspektrum im Bereich von 300 bis 850 nm aufgenommen. Als Referenzwert diente das jeweilige Lösungsmittel des Testansatzes.

4.2.3.2 Ergebnisse

Die Spektren weisen drei verschiedene Absorptionsmaxima für Hämoglobin auf. In Tabelle 6 sind diese für die verschiedenen Testansätze aufgelistet. Die grafischen Darstellungen der Absorptionsspektren sind beispielhaft für die Totalhämolysen mit Aqua dest. und Einfrieren (jeweils mit und ohne UV-Bestrahlung) abgebildet (vgl. Abbildungen 15-18).

Tabelle 6: Absorptionsmaxima von Hämoglobin in verschiedenen Testansätzen

		mit UV		ohne UV	
		Wellenlänge (nm)	Absorption	Wellenlänge (nm)	Absorption
globales Maximum	<i>Aqua dest.</i>	415	0,6839	415	0,5908
	<i>SDS</i>	403	0,4383	404	0,4378
	<i>Einfrieren</i>	414	0,8036	414	0,7760
	<i>Zentrifugieren</i>	413	0,0691	414	0,1059
lokales Maximum 1	<i>Aqua dest.</i>	542	0,0751	542	0,0649
	<i>SDS</i>	-	-	-	-
	<i>Einfrieren</i>	542	0,0848	542	0,0830
	<i>Zentrifugieren</i>	541	0,0056	541	0,0098
lokales Maximum 2	<i>Aqua dest.</i>	578	0,0797	578	0,0689
	<i>SDS</i>	-	-	-	-
	<i>Einfrieren</i>	578	0,0886	578	0,0867
	<i>Zentrifugieren</i>	578	0,0059	578	0,0104

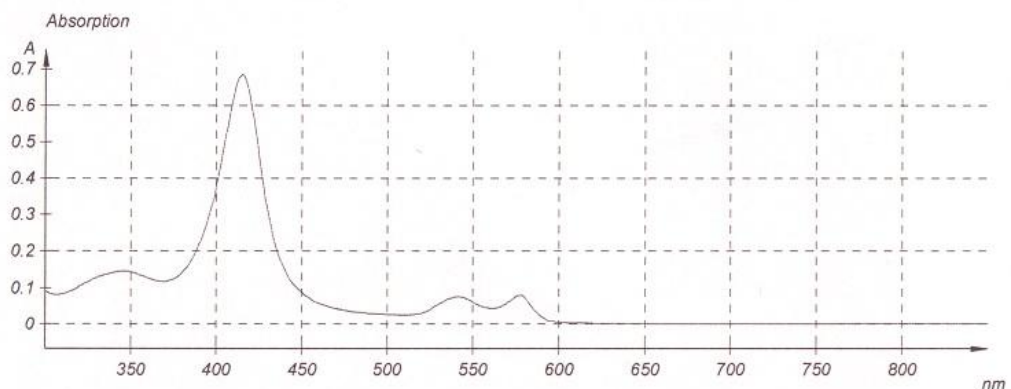


Abbildung 15: Totalhämolysen durch Aqua dest.; mit UV-Bestrahlung

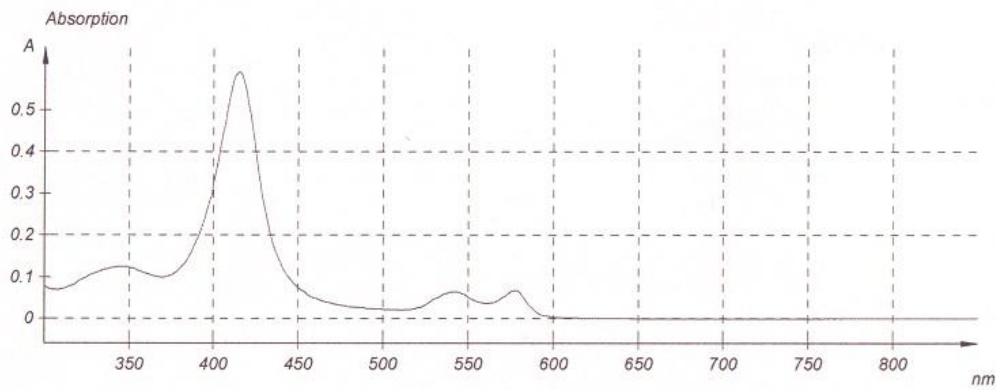


Abbildung 16: Totalhämolyse durch Aqua dest.; ohne UV-Bestrahlung

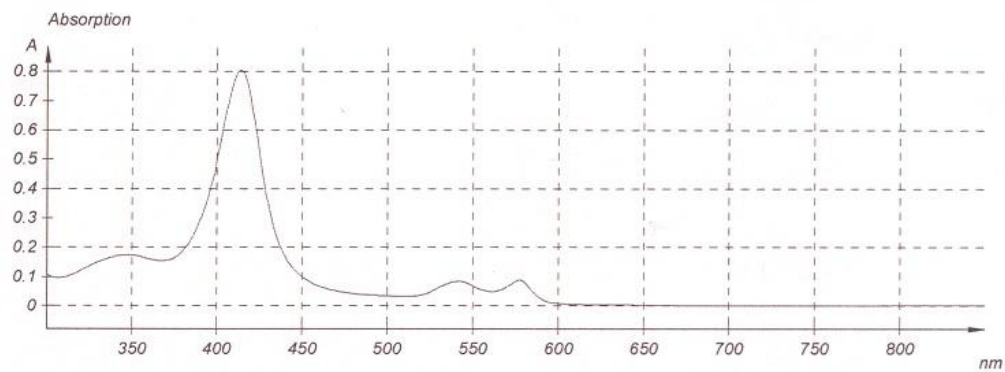


Abbildung 17: Totalhämolyse durch Gefrieren; mit UV-Bestrahlung

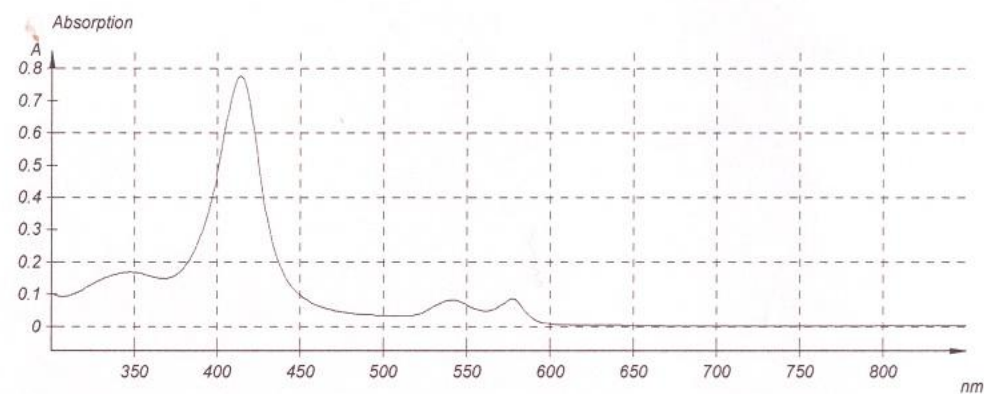


Abbildung 18: Totalhämolyse durch Gefrieren; ohne UV-Bestrahlung

Für jeden Ansatz hat sich ein globales Maximum bei einer Wellenlänge von etwa 414 nm ergeben. Zusätzlich traten lokale Maxima bei ca. 542 nm und 578 nm auf, außer bei den Ansätzen mit SDS. Bei 630 nm, dem Absorptionsmaximum von

Methämoglobin, sind für alle Ansätze keine Absorptionen messbar, d.h. es bildet sich bei UV-Bestrahlung keine detektierbaren Mengen an Methämoglobin.

Die höchsten Absorptionen wurden bei den tiefgefrorenen und den mit Aqua dest. behandelten Erythrozyten erreicht. Diese beiden Verfahren eignen sich für die Erzeugung einer Totalhämolyse. Die zentrifugierten bzw. mit SDS-Lösung versetzten Zellen zeigten eine geringere Hämolyse. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde Aqua dest. zur Erzeugung der Totalhämolyse in den weiteren Versuchen verwendet.

Da das globale Maximum bei einer Wellenlänge von ca. 414 nm liegt, sollte diese als Detektionswellenlänge für die weiteren Messungen gewählt werden. Da bei dem verwendeten Multiplattenreader eine Messung bei 414 nm aufgrund eines fehlenden Filters für diese Wellenlänge nicht möglich ist, wurde überprüft, ob eine Messung bei 405 nm ebenfalls möglich ist (vgl. 4.2.4, Abbildung 19).

4.2.4 SDS-abhängiger Red-blood-cell-Test

Der SDS-abhängige Red-blood-cell-Test wurde als Referenzsystem zum Photohämolyse-Test genutzt. Dabei wurde die membranschädigende Wirkung von verschiedenen SDS-Konzentrationen untersucht. Die Messung der Hämoglobinfreisetzung erfolgte bei verschiedenen Wellenlängen sowohl in Küvetten mit dem Spektralphotometer Helios Beta als auch in Mikrotiterplatten mit dem Multiplattenreader htII, sodass die unterschiedlichen Messtechniken und Wellenlängen verglichen werden konnten.

4.2.4.1 Methode

Die RBC-Suspension wurde wie beschrieben hergestellt (vgl. 4.2.2) und die Zellzahl kontrolliert.

Als Ausgangslösungen wurden zwei SDS-Stammlösungen hergestellt. Für die Stammlösung 1 mit einer SDS-Konzentration von 20 mg/ml wurden 100 mg SDS in einen 5 ml Maßkolben eingewogen, mit PBS bis zur Markierung aufgefüllt und 5 min im Ultraschallbad behandelt. Für die Stammlösung 2 ($c = 1$ mg/ml) wurden 250 μ l Stammlösung 1 in einen 5 ml Maßkolben pipettiert und mit PBS-Puffer bis zur Marke aufgefüllt. Das Pipettierschema der SDS-Verdünnungslösungen ist in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: SDS-Verdünnungen

Konzentration [mg/ml]	V_{SL2} [µl]	V_{PBS} [µl]
0,01	20	1980
0,02	40	1960
0,03	60	1940
0,04	80	1920
0,05	100	1900

Für die Messungen wurden von jeder Verdünnung 1950 µl in ein 2 ml Reaktionsgefäß pipettiert und 50 µl der RBC-Suspension hinzugefügt.

Zum Vergleich wurden außerdem eine 100 %- und eine 0 %-Hämolyse-Probe sowie die zugehörigen Blindwerte hergestellt. Für die 100 %-Hämolyse wurden 1950 µl Aqua dest. mit 50 µl RBC-Suspension bzw. einem Citratpuffer/PBS-Gemisch (Verhältnis 1:10) für den Blindwert vermischt. Für die 0 %-Hämolyse und den zugehörige Blindwert wurde statt Aqua dest. PBS verwendet.

Für die SDS-Verdünnungen mussten keine separaten Blindwerte hergestellt werden, da vorab die Absorption der höchsten verwendeten Konzentration gegenüber PBS-Puffer gemessen wurde und sich keine Absorptionsunterschiede zeigten.

Sämtliche Ansätze wurden 10 min auf dem Schüttler inkubiert und anschließend 1 min bei 8160 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, homogenisiert und auf zwei Küvetten verteilt. Danach wurde, jeweils als Doppelbestimmung, die Absorption bei 414 nm mit dem Spektralphotometer gemessen. Dabei diente der 100 %- Blindwert als Nullabgleich für die 100 %-Hämolyse und der 0 %- Blindwert als Abgleich für die restlichen Proben.

Nach erfolgter Messung wurden aus jeweils einer Küvette jeder Lösung 2 x 100 µl entnommen und auf eine Mikrotiterplatte aufgetragen. Die Absorptionsmessung erfolgte hier bei 405 nm mit dem Multiplattenreader. Statt eines Nullabgleichs wurde die Absorption der Blindwerte mitbestimmt und anschließend von der Probenabsorption subtrahiert.

4.2.4.2 Ergebnisse

Aus den Absorptionen der Doppelbestimmungen wurden jeweils die Mittelwerte gebildet und anschließend die Hämolyse in Prozent berechnet. Die Absorption der 100 %-Hämolyse jeder Messreihe wurde dafür gleich 100 % gesetzt. Die Absorptionen der restlichen Proben wurden dazu ins Verhältnis gesetzt (vgl. Anlagen, Teil 1). Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Werte für die SDS-Verdünnungen grafisch aufgetragen, siehe Abbildung 19.

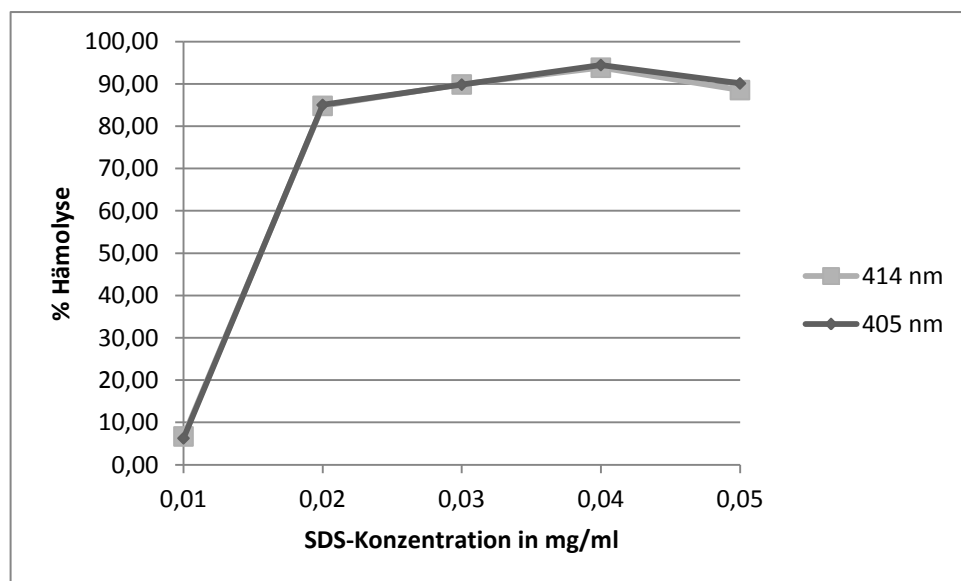


Abbildung 19: Abhängigkeit der Hämolyse von der SDS-Konzentration bei verschiedenen Wellenlängen

Die Ergebnisse zeigen, dass eine Zunahme der Hämolyse bei steigenden Konzentrationen der membranzerstörenden Substanz (SDS) erfolgt, und dass diese Zunahme photometrisch messbar ist. Die Kurvenverläufe sind gleich, d.h. der Unterschied zwischen den beiden untersuchten Wellenlängen hat keinen Einfluss auf die relativen Hämolysewerte. Die Verwendung der Mikrotiterplatten erwies sich trotz des geringeren Messvolumens als genauso geeignet, wie die Verwendung von Küvetten. Da die Absorptionswerte bei Verwendung der Mikrotiterplatten sehr klein waren, wurde für weitere Messungen ein Messvolumen von 250 µl genutzt.

4.2.5 Überprüfung der Bestrahlungsgleichmäßigkeit

Um eine gleichmäßige Bestrahlung und eine optimale Durchmischung der Proben zu gewährleisten, wurden sowohl die Proben als auch die UV-Lampe auf einen Schüttler gestellt, siehe Abbildung 20. Für sämtliche UV-Bestrahlungen wurde die UV-Lampe von Wepa Apothekenbedarf genutzt.

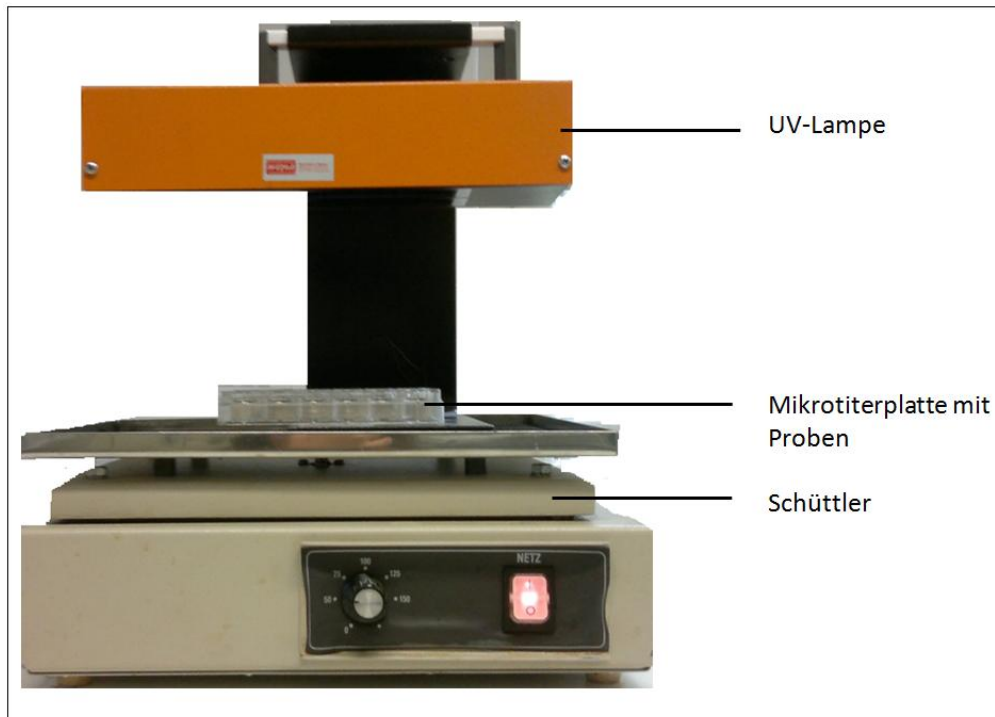


Abbildung 20: Versuchsaufbau zur Probenbestrahlung

Die UV-Bestrahlung der Proben erfolgte in einer Mikrotiterplatte mit 24 Kavitäten. Dazu musste überprüft werden, ob die Proben in der Mikrotiterplatte gleichmäßig bestrahlt werden.

4.2.5.1 Methode

Zur Überprüfung der gleichmäßigen Ausstrahlung der Mikrotiterplatte musste zuerst die RBC-Suspension hergestellt (vgl. 4.2.2) und die Zellzahl überprüft werden.

1500 µl RBC-Suspension wurden zu 58,5 ml PBS-Puffer pipettiert. Von dieser Lösung sind jeweils 2 ml in die 24 Kavitäten einer Mikrotiterplatte überführt und 1 h UV-Strahlung ausgesetzt worden. Der Inhalt der Kavitäten wurde anschließend in

2 ml Reaktionsgefäße überführt und 1 min bei 8160 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, homogenisiert und auf zwei Küvetten verteilt. Die Messung der Absorptionen erfolgte bei 414 nm gegen PBS-Puffer. Aus den Doppelbestimmungen wurden die Mittelwerte der Absorptionen berechnet.

4.2.5.2 Ergebnisse

Tabelle 8 zeigt die Mittelwerte der Absorptionen für die Lösungen aus den jeweiligen Kavitäten der Mikrotiterplatte sowie die Variationskoeffizienten (VK) für die Zeilen bzw. Spalten.

Tabelle 8: Für die jeweiligen Kavitäten der Mikrotiterplatte ermittelte Absorptionen

	1	2	3	4	5	6	VK
A	0,145	0,151	0,158	0,147	0,153	0,148	3,14 %
B	0,155	0,152	0,147	0,154	0,154	0,155	2,00 %
C	0,154	0,148	0,151	0,155	0,154	0,152	1,69 %
D	0,152	0,153	0,149	0,154	0,154	0,151	1,28 %
VK	2,98 %	1,43 %	3,17 %	2,42 %	0,33 %	1,91 %	

Aus den Ergebnissen wird ersichtlich, dass die Mikrotiterplatte gleichmäßig ausgestrahlt wird und somit für die Probenbestrahlung geeignet ist. Der größte Variationskoeffizient beträgt 3,14 % und liegt damit für die Versuche im akzeptablen Bereich.

4.2.6 Einfluss der Bestrahlungsdauer auf die Hämolyserate

Um eine optimale Bestrahlungsdauer für den Photohämolysetest zu ermitteln, musste der Einfluss der Bestrahlungsdauer auf die Hämolyserate untersucht werden. Die Bestrahlungsdauer muss so gewählt werden, dass eine Hämolyse erkennbar ist, aber noch keine Totalhämolyse erreicht ist.

4.2.6.1 Methode

Für die Untersuchung des Einflusses der Bestrahlungsdauer wurden 1500 µl RBC-Suspension zu 58,5 ml PBS-Puffer pipettiert. Von dieser Lösung wurden je 2 ml in die 24 Kavitäten einer Mikrotiterplatte überführt und 4 h mit UV-Licht bestrahlt. Nach verschiedenen Bestrahlungsdauern (5, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 180, 240 min) entnahm man den Inhalt von zwei Kavitäten, überführte ihn in 2 ml Reaktionsgefäße und zentrifugierte 1 min bei 8160 x g. Von beiden Überständen wurden 8 x 250 µl auf eine Mikrotiterplatte (96 Kavitäten) aufgetragen und die Absorptionen bei 405 nm mit dem Multiplattenreader ermittelt. Die Absorption von PBS-Puffer bestimmte man ebenfalls und subtrahierte sie von den ermittelten Werten. Für jede Bestrahlungsdauer wurde der Mittelwert aller Messwerte berechnet.

4.2.6.2 Ergebnisse

In Abbildung 21 sind die Absorptionen in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer grafisch aufgetragen (Für die Messwerte siehe Anlagen, Teil 2).

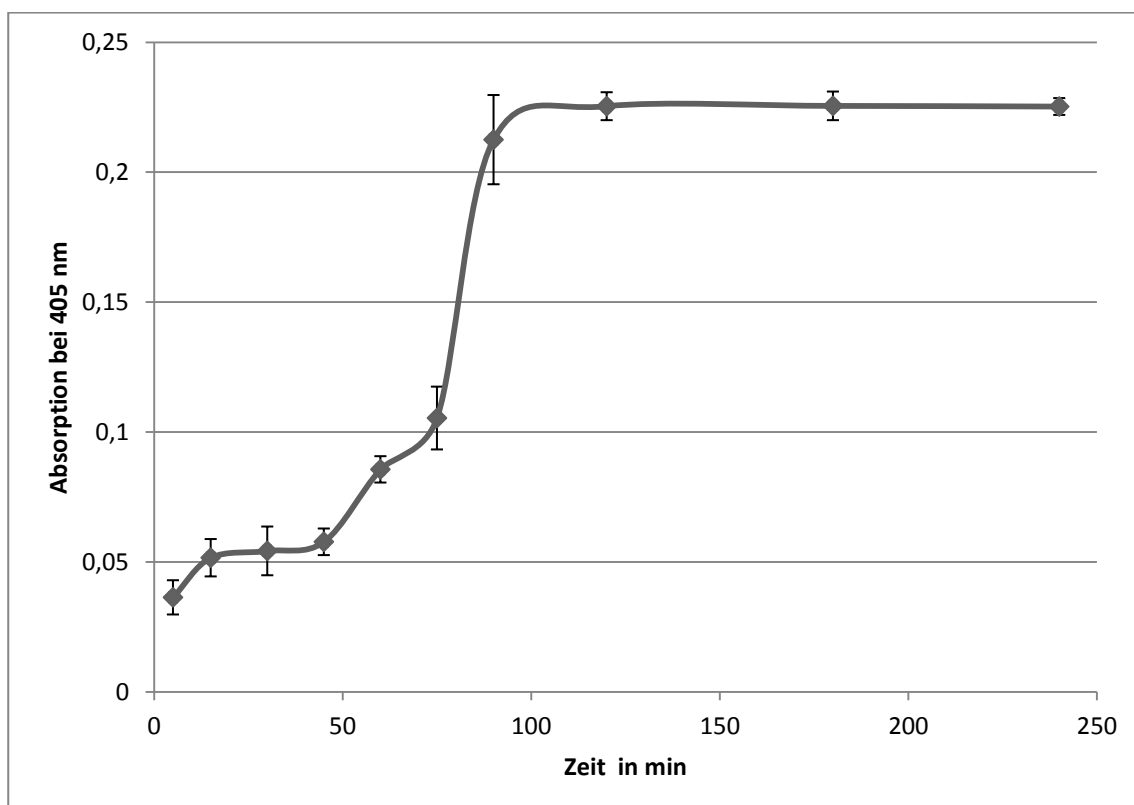


Abbildung 21: Abhängigkeit der Hämolyse von der Bestrahlungsdauer

Bis zu einer Bestrahlungsdauer von 100 min steigen die Absorptionswerte an. Nach dieser Zeitdauer bleiben die Absorptionswerte konstant, d.h. die UV-bedingte Totalhämolyse der Erythrozyten ist nach 100 min Bestrahlung erreicht. Bei allen weiteren Versuchen wurde mit einer Bestrahlungsdauer von 60 min gearbeitet, sodass noch keine Totalhämolyse erfolgt.

4.2.7 RBC-Photohämolysetest für Sonnenschutzcreme

Für den RBC-Photohämolysetest wurden verschiedene Konzentrationen der Sonnenschutzcreme zusammen mit einer RBC-Suspension inkubiert. Die Inkubation erfolgte für einen Probenansatz ohne UV-Bestrahlung (Dunkelreaktion) und für einen identischen Ansatz mit UV-Bestrahlung. Die Dunkelreaktion entspricht dem einfachen RBC-Test, der das Hämolyserisiko von chemischen Substanzen untersucht. Mit den UV-bestrahlten Proben soll der Einfluss von UV-Strahlung auf die Hämolysewirkung in Anwesenheit von Sonnenschutzprodukten untersucht werden. Es wird davon ausgegangen, dass Sonnenschutzprodukte eine schützende Wirkung auf bestrahlte Erythrozyten besitzen und dass sich diese Schutzleistung in einer Verringerung der Hämolyserate darstellt.

4.2.7.1 Methode

Für die Probenverdünnungen der Sonnenschutzcreme wurde eine Stammlösung mit einer Konzentration von 20 mg/ml hergestellt, indem 100 mg Probe in einen 5 ml Maßkolben eingewogen, mit PBS-Puffer bis zur Markierung aufgefüllt und 5 min im Ultraschallbad behandelt. Anschließend wurden aus 250 µl Stammlösung und 4750 µl PBS eine zweite Stammlösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml hergestellt, aus der je 10 ml der in Tabelle 9 aufgeführten Verdünnungen mit PBS-Puffer hergestellt wurden. Die eingesetzten Probenkonzentrationen wurden anhand der Ergebnisse von durchgeführten Vorversuchen ausgewählt.

Tabelle 9: Probenverdünnungen für RBC-Photohämolysetest

Bezeichnung	Probenkonzentration [mg/ml]
A	0,02
B	0,04
C	0,06
D	0,08
E	0,10
F	0,15
G	0,20
H	0,25
I	0,50
J	0,75

Zusammen mit der nach Punkt 4.2.2 hergestellten RBC-Suspension wurden aus den jeweiligen Probenverdünnungen folgende Testlösungen und Blindwerte (Tabelle 10) hergestellt. Es wurden außerdem Lösungen für die 100 %-Hämolyse und die 0 %-Hämolyse sowie die zugehörigen Blindwerte hergestellt.

Tabelle 10: Pipettierschema zur Herstellung der Testlösungen und Blindwerte

Bezeichnung	RBC-Suspension	Aqua dest.	Probenverdünnung	PBS
100 % Hämolyse	100 µl	3900 µl	-	-
BW 100 % Hämolyse	-	3900 µl	-	100 µl
0 % Hämolyse	100 µl	-	-	3900 µl
BW 0 % Hämolyse	-	-	-	4000 µl
Probenverdünnungen A-J	100 µl	-	3900 µl A-J	-
BW Probeverdünnungen A-J	-	-	3900 µl A-J	100 µl

Von den Lösungen wurden jeweils 2 ml in die Kavitäten zweier Mikrotiterplatten (24 Kavitäten) gegeben, sodass zwei identisch beschickte Mikrotiterplatten vorlagen. Eine Platte setzte man 60 min auf einem Schüttler UV-Bestrahlung aus, die andere bewahrte man lichtdicht geschützt 60 min auf dem Schüttler auf. Anschließend wurden beide Platten für die Nachinkubation 30 min lichtdicht geschützt auf dem Schüttler aufbewahrt.

Die Lösungen überführte man in 2 ml Reaktionsgefäße und zentrifugierte diese 1 min bei 8160 x g. Die Überstände wurden in neue Reaktionsgefäße überführt und homogenisiert. Davon wurden pro Lösung 6 x 250 µl auf Mikrotiterplatten (96 Kavitäten) aufgetragen und bei 405 nm photometrisch vermessen.

4.2.7.2 Ergebnisse

Die Absorptionen der Blindwerte wurden von den Probenwerten subtrahiert. Aus den Messwerten der Sechsfachmessungen wurden die Mittelwerte gebildet und die Hämolyserate in Prozent (bezogen auf die zur Versuchsreihe gehörende 100 %-Hämolyse-Probe) berechnet (vgl. Anlagen, Teil 3). In den Abbildungen 22 und 23 sind die Abhängigkeiten der Hämolyseraten von der Probenkonzentration grafisch dargestellt.

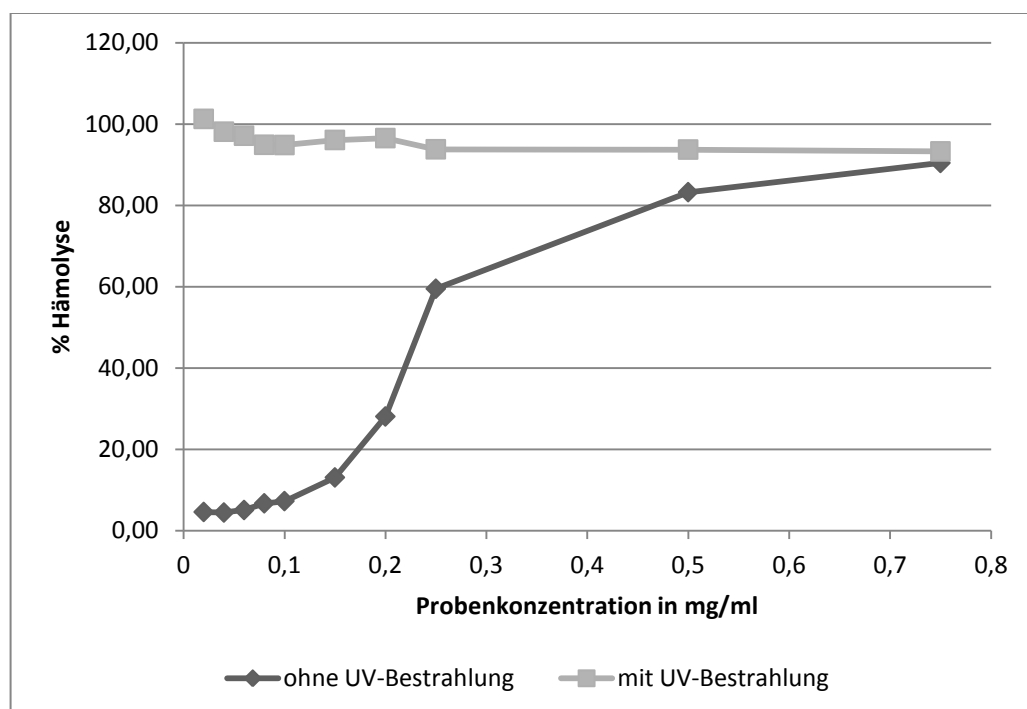


Abbildung 22: Abhängigkeit der Hämolyserate von der Konzentration an Sonnenschutzcreme LSF 6

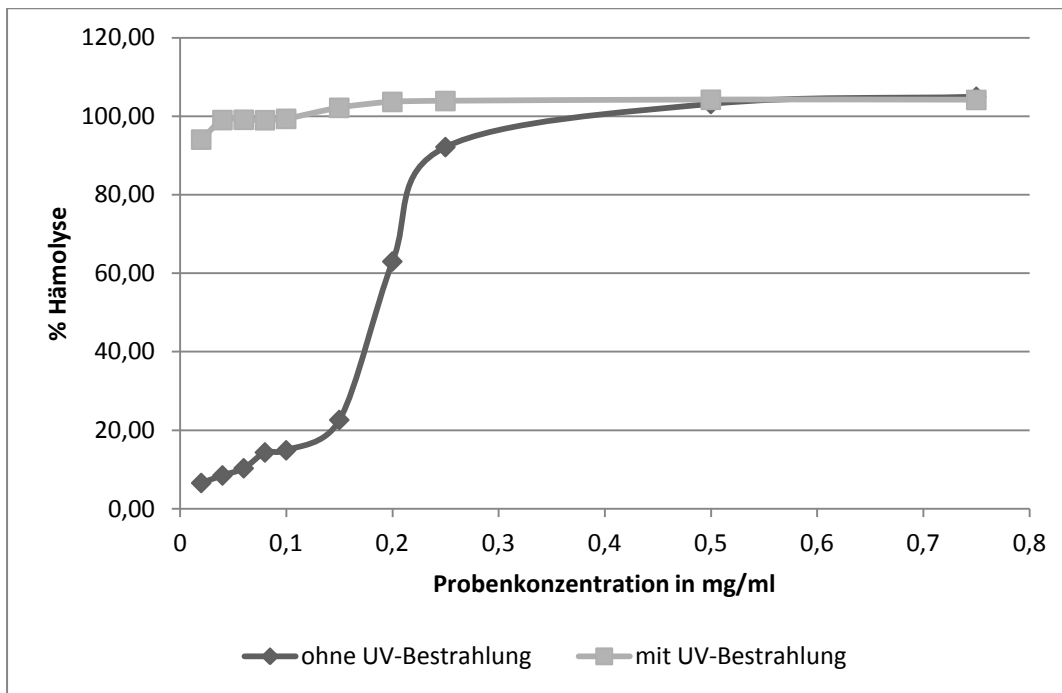


Abbildung 23: Abhängigkeit der Hämolyserate von der Konzentration an Sonnenschutzcreme LSF 50

Bei beiden Sonnenschutzcremes nimmt die Hämolyserate in Abwesenheit von UV-Strahlung ab einer Probenkonzentration von 0,1 mg/ml zu, d.h. bei beiden Sonnenschutzcremes lässt sich ein konzentrationsabhängiges Irritationspotential anhand einer ausgelösten Hämolyse nachweisen. Dies ist ein Indiz für eine hautirritierende Wirkung der chemischen Substanzen. Für die Sonnenschutzcreme LSF 50 ist die Zunahme stärker. Zu begründen ist dies mit der größeren Menge an UV-Filtern in diesem Produkt, da bekannt ist, dass UV-Filtersubstanzen irritative Reaktionen hervorrufen [SCHAUDER, 2001]. Die Hämolyseraten der UV-bestrahlten Proben liegen für sämtliche eingesetzten Probenkonzentrationen im Bereich einer Totalhämolyse. Die Hämolyserate wird durch die Kombination aus UV-Strahlung und chemischer Einflussgröße über den gesamten Konzentrationsbereich verstärkt.

4.2.8 Überprüfung der Reproduzierbarkeit

Um die Reproduzierbarkeit des RBC-Photohämolysetests zu überprüfen, wurden für ausgewählte Konzentrationen vier Ansätze von jeweils einer Sonnenschutzcreme hergestellt und unter gleichen Bedingungen auf das Hämolyserisiko

untersucht. Die Werte wurden anschließend verglichen und statistisch ausgewertet.

4.2.8.1 Methode

Es wurden pro Sonnenschutzcreme vier Einwaagen von 100 mg in 5 ml Maßkolben vorgenommen. Diese füllte man bis zur Markierung mit PBS-Puffer auf und behandelte sie 5 min im Ultraschallbad. Aus diesen Stammlösungen ($c = 20 \text{ mg/ml}$) wurde für jeden Ansatz eine zweite Stammlösung ($c = 1 \text{ mg/ml}$) hergestellt, aus der man je 10 ml der in Tabelle 11 eingetragenen Probenverdünnungen herstellte.

Tabelle 11: Probenverdünnungen zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit

Bezeichnung	Probenkonzentration [mg/ml]
A	0,02
B	0,06
C	0,10
D	0,20
E	0,50

Aus den Probenverdünnungen eines jeden Ansatzes stellte man folgende Testlösungen und Blindwerte (Tabelle 12) her. Es wurden außerdem Lösungen für die 100 %-Hämolyse und die 0 %-Hämolyse sowie die zugehörigen Blindwerte hergestellt. Die RBC-Suspension wurde nach Punkt 4.2.2 hergestellt. Da nur eine Mikrotiterplatte mit 24 Kavitäten optimal von der UV-Lampe ausgeleuchtet werden konnten, stellte man die Ansätze 3 und 4 zeitversetzt her.

Tabelle 12: Pipettierschema zur Herstellung der Testlösungen und Blindwerte für die Überprüfung der Reproduzierbarkeit

Bezeichnung	RBC-Suspension	Aqua dest.	Probenverdünnung	PBS
100 % Hämolyse	100 µl	3900 µl	-	-
BW 100 % Hämolyse	-	3900 µl	-	100 µl
0 % Hämolyse	100 µl	-	-	3900 µl
BW 0 % Hämolyse	-	-	-	4000 µl
Probenverdünnungen A-E	100 µl	-	3900 µl A-E	-
BW Probeverdünnungen A-E	-	-	3900 µl A-E	100 µl

Von den Lösungen wurden jeweils 2 ml in die Kavitäten zweier Mikrotiterplatten gegeben. Eine Platte setzte man auf einem Schüttler 60 min UV-Bestrahlung aus, die andere bewahrte man lichtdicht geschützt 60 min auf dem Schüttler auf. Anschließend wurden beide Platten für die Nachinkubation 30 min lichtdicht geschützt auf dem Schüttler aufbewahrt.

Die Lösungen wurden in Mikroreaktionsgefäße überführt und 1 min bei 8160 x g zentrifugiert. Die Überstände überführte man in neue Reaktionsgefäße und homogenisierte sie. Davon wurden pro Lösung 6 x 250 µl auf Mikrotiterplatten (96 Kavitäten) aufgetragen und bei 405 nm photometrisch vermessen.

4.2.8.2 Ergebnisse

Die Absorptionen der Blindwerte wurden von den Probenwerten subtrahiert. Aus den Messwerten der Sechsfachmessungen wurden die Mittelwerte gebildet und die Hämolyserate in Prozent (bezogen auf die 100 %-Hämolyse-Probe) berechnet.

Aus den Hämolyseraten der einzelnen Ansätze wurde der Mittelwert (MW) für jede Probenkonzentration berechnet und die Standardabweichung (σ) ermittelt. Die Abbildungen 24 und 25 zeigen die statistischen Kennwerte in Abhängigkeit von der Konzentration.

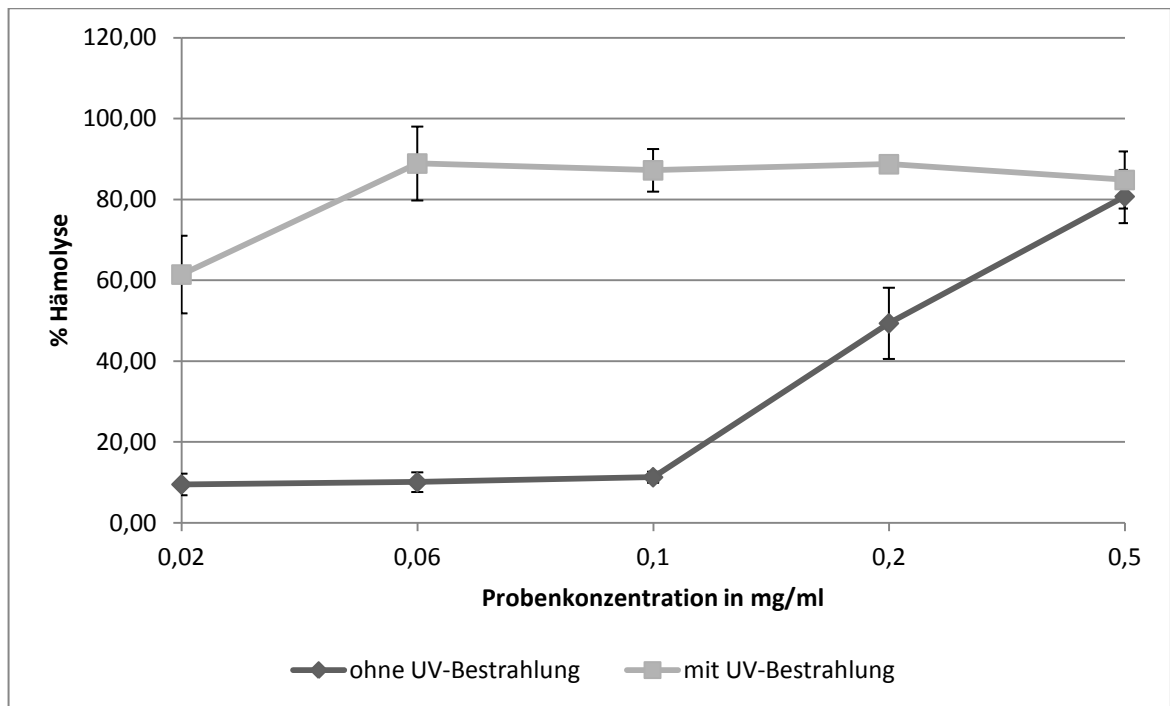


Abbildung 24: Abhängigkeit der gemittelten Hämolysenrate von der Probenkonzentration sowie Standardabweichungen (Sonnenschutzcreme LSF 6)

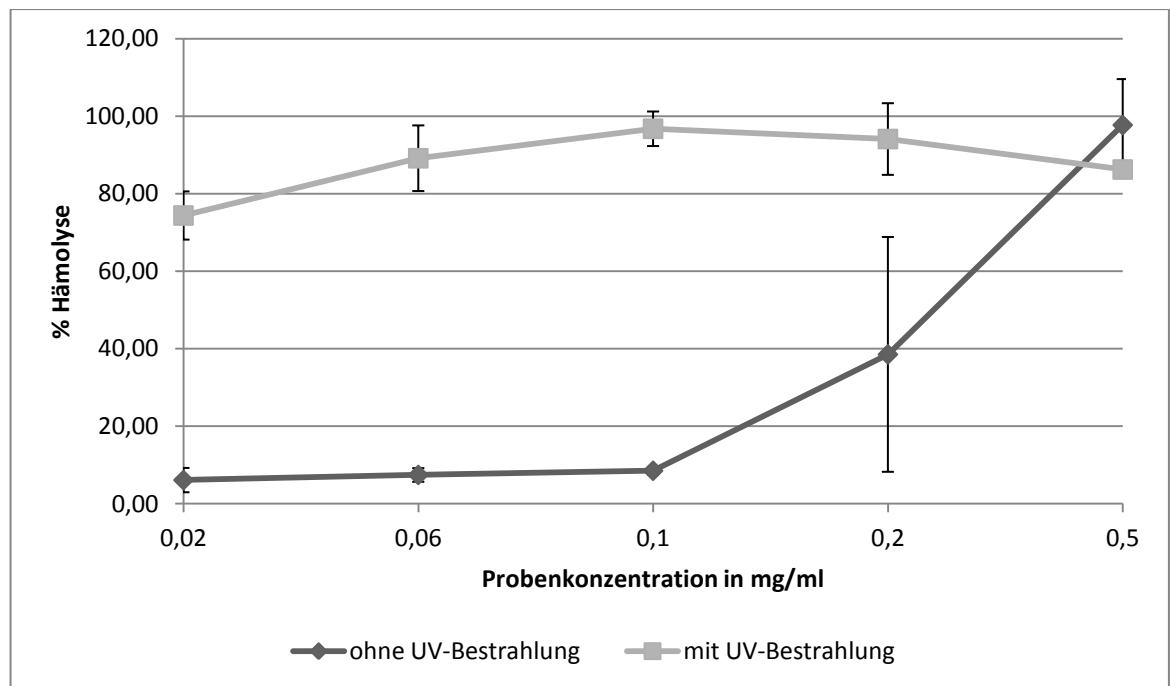


Abbildung 25: Abhängigkeit der gemittelten Hämolysenrate von der Probenkonzentration sowie Standardabweichungen (Sonnenschutzcreme LSF 50)

Aus den Ergebnissen wird ersichtlich, dass die Änderung der Hämolysenrate einem reproduzierbaren Trend unterliegt. In Konzentrationsbereichen, in denen sich die

Hämolyserate stark ändert, kommt es zu höheren Standardabweichungen. Dies ist darauf zurückzuführen, dass es sich um ein biologisches Testsystem handelt, welches natürlichen Schwankungen unterliegt. Die Abweichungen haben jedoch nur Einfluss auf die Änderung der Hämolyserate bei einer Konzentration und nicht auf den tendenziellen Verlauf über den gesamten Konzentrationsbereich.

5 Fazit

Absorptionsmessungen von Sonnenschutzprodukten in ethanolischer Lösung stellen ein geeignetes in-vitro-Testsystem zur Überprüfung der Lichtschutzwirkung der Präparate dar. Es sind vergleichende Aussagen zu Produkten mit unterschiedlichen Zusammensetzungen und Lichtschutzfaktoren möglich. Es muss darauf geachtet werden, dass die relevanten Inhaltsstoffe der Formulierungen in Ethanol löslich sind.

Bei dem entwickelten Testsystem handelt es sich nicht um eine Alternative zu bestehenden Testmethoden, sondern um eine Screening-Methode zur Abschätzung der Lichtschutzwirkung. Es stellt eine kostengünstige und einfach anzuwendende Methode für vergleichende und orientierende Untersuchungen, vor allem während der Produktentwicklung, dar. Mit Hilfe der Methode ist die Abschätzung der Schutzwirkung sowohl im UVB-, als auch im UVA-Bereich gleichzeitig möglich.

Mit einer einfachen Erweiterung des Testsystems um eine UV-Bestrahlung können zusätzlich Aussagen zur Photostabilität des Produkts getroffen werden. Dabei kann nicht nur festgestellt werden, ob es sich um ein photostabiles Produkt handelt, sondern auch eine Aussage zur verbleibenden Schutzleistung nach der Einwirkung von UV-Strahlung getroffen werden. Da die Methode für vollständige Produktformulierungen angewendet werden kann, werden mögliche Wechselwirkungen der Inhaltsstoffe mit berücksichtigt.

Mit dem RBC-Photohämolysetest können Aussagen zum Hautirritationspotenzial von kosmetischen Produkten getroffen werden. Durch die Dunkelreaktion des Testsystems ist eine Abschätzung über das Vorhandensein eines Irritationspotenzials durch die Inhaltsstoffe möglich. Durch die UV-Bestrahlung können Aussagen über mögliche photosensibilisierende und phototoxische Eigenschaften getroffen werden. Diese können entstehen, wenn sich die Inhaltsstoffe der Produkte bei UV-Bestrahlung chemisch verändern.

Obwohl es sich bei den untersuchten Produkten um Sonnenschutzprodukte handelt, deren Wirksamkeit anhand der Absorptionsmessungen bestätigt werden

konnte, war im Photohämolysetest keine Schutzwirkung erkennbar. Es wurde nachgewiesen, dass die Hämolyserate von Erythrozyten durch UV-Bestrahlung verstärkt wird. Die Arbeitshypothese, dass Sonnenschutzprodukte eine schützende Wirkung auf bestrahlte Erythrozyten besitzen und dass sich diese Schutzleistung in einer Verringerung der Hämolyserate darstellt, konnte nicht bestätigt werden. Durch die Kombination der Irritationswirkung von chemischen Substanzen und UV-Strahlung auf Erythrozyten wurde eine Totalhämolysen ausgelöst. Der RBC-Photohämolysetest eignet sich unter den gewählten Testbedingungen nicht für in-vitro-Abschätzungen der Lichtschutzwirkung von derartigen Sonnenschutzprodukten.

Literatur

BODE, 2004

Bode, C.: Phototoxikologie der Kaliumkanalblocker Psora-3 und Psora-4: In vitro-Untersuchungen zur Photoirritation, Photokarzinogenität und Photoallergenität. Kiel, Christian-Albrechts-Universität, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Dissertation 2004

BRETT, 2010

Brett, S.: Citrat-Antikoagulation während der CVVHD – eine vergleichende prospektive Observationsstudie. Düsseldorf, Heinrich-Heine-Universität, Medizinische Fakultät, Dissertation, 2010

BfR, 2003

Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR): UV-Filtersubstanzen in Sonnenschutzmitteln - Stellungnahme des BfR vom 6. August 2003. URL: http://www.bfr.bund.de/cm/343/uv_filter_in_sonnenschutzmitteln.pdf, verfügbar am 01.07.2011

CVUA, 2003

Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Karlsruhe: Sonnenschutzmittel – Wie gut ist der UV-A-Schutz? URL: http://cvua-karlsruhe.de/eua/bgkm/2003_uvason.htm, verfügbar am: 03.08.2011

EU-Kommission, 2006

EU-Kommission: Empfehlung der Kommission über die Wirksamkeit von Sonnenschutzmitteln und diesbezügliche Herstellerangaben. URL: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:265:0039:0043:DE:PDF>, verfügbar am 01.08.2011

HÄNSEL & STICHER, 2010

Hänsel, R.; Sticher, O.: Pharmakognosie, Phytopharmazie. Heidelberg, Springer Medizin Verlag, 2010

HINNEBURG, 2004

Hinneburg, I.: Extrakte aus Herba Fagopyri als Photoprotektiva: Untersuchungen zur Herstellung, Wirksamkeit, Galenik und Biopharmazie. Halle, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Mathematisch-Naturwissenschaftlich/Technische Fakultät, Dissertation, 2004

KEMPE, 2007

Kempe, D.: Programmierter Erythrozyten-Zelltod bei Bleivergiftungen und Eisenmangelanämie. Tübingen, Eberhard-Karls-Universität, Medizinische Fakultät, Dissertation, 2007

LANG & LANG, 2007

Lang, F.; Lang, P.: Basiswissen Physiologie. Heidelberg, Springer Medizin Verlag, 2010

LINß & FANGHÄNEL, 1998

Linß, W.; Fanghänel, J. (Hrsg.): Histologie: Zytologie, allgemeine Histologie, mikroskopische Anatomie. Berlin, Walter de Gruyter GmbH & Co., 1998

MANG & KRUTMANN, 2003

Mang, R.; Krutmann, J.: Sonnenschutz im Urlaub. In: Der Hautarzt. – Heidelberg, Springer Medizin Verlag – 6/2003, S. 498-505

OSTERWALDER et al., 2001

Osterwalder, U.; Luther, H.; Herzog, B.: Sun Protection beyond the Sun Protection Factor – New Efficient and Photostable UV-A Filters. In: SÖFW-Journal. – Augsburg, Verlag für chemische Industrie H. Ziolkowsky – 7/2001, S. 45-54

PAPE, 1992

Pape, W.: Red Blood Cell (RBC) Test System (INVITTOX Protocol 37).
URL: http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/view_doc.cfm?iddoc=625&tdoc=prot,
verfügbar am 15.06.2011

PAPE & PFANNENBECKER, 1994

Pape, W.; Pfannenbecker, U.: Red Blood Cell (RBC) Photo Assay - Photo-haemolysis and Haemoglobin Oxidation (INVITTOX Protocol 81). URL: http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/view_doc.cfm?iddoc=669&tdoc=prot,
verfügbar am 15.06.2011

SAUPE, 2004

Saupe, A.: Pharmazeutisch-kosmetische Anwendungen Nanostrukturierter Lipidcarrier (NLC): Lichtschutz und Pflege. Berlin, Freie Universität Berlin, Fachbereich Biologie/Chemie/Pharmazie, Dissertation, 2004

SCHAUDER, 2001

Schauder, S.: Dermatologische Verträglichkeit von UV-Filtern, Duftstoffen und Konservierungsmitteln in Sonnenschutzpräparaten. In: Bundesgesundheitsblatt – Gesundheitsforschung – Gesundheitsschutz. – Heidelberg, Springer Medizin Verlag – 5/2001, S.471-479

SCHMIDT & LANG, 2007

Schmidt, R. F.; Lang, F. (Hrsg.): Physiologie des Menschen, mit Pathophysiologie. Heidelberg, Springer Medizin Verlag, 2007

SCHRADER, 2001

Schrader, K.: Die Sonnenschutzfaktorbestimmung: Kritische Bewertung aus der Sicht eines Prüfinstitutes. In: Bundesgesundheitsblatt – Gesundheitsforschung – Gesundheitsschutz. – Heidelberg, Springer Medizin Verlag – 5/2001, S. 457-462

SINGER & NICOLSON, 1972

Singer, S. J.; Nicolson, G. L.: The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. In: Science. New York, AAAS – 23/1972, S. 720-31.

SOJKA, 2005

Sojka, C.: Eigenschaften und antimikrobielle Wirksamkeit von β -Triketonen in ätherischen Ölen der Myrtaceae. Hamburg, Universität Hamburg, Fachbereich Chemie, Dissertation, 2005

SPIELMANN et al., 2000

Spielmann, H.; Müller, L.; Awerbeck, D.; Balls, M.; Brendler-Schwaab, S.; Castell, J. V.; Curren, R.; de Silva, O.; Gibbs, N. K.; Liebsch, M.; Lovell, W. W.; Merk, H. F.; Nash, J. F.; Neumann, N. J.; Pape, W. J. W.; Ulrich, P.; Vohr, H.-W.: The Second ECVAM Workshop on Phototoxicity Testing. In: Alternatives to Laboratory Animals. – 28/2000, S. 777 – 814

TASKAYA, 2011

Taskaya, G.: Kontinuierliche venovenöse Hämofiltration mit regionaler Citrat-Antikoagulation bei blutungsgefährdeten Patienten auf der Intensivpflegestation. Düsseldorf, Heinrich-Heine-Universität, Medizinische Fakultät, Dissertation, 2011

UMBACH, 2004

Umbach, W.: Kosmetik und Hygiene von Kopf bis Fuß. Weinheim, Wiley-VCH Verlag, 2004

WEBER & SCHULMEISTER, 2011

Weber, M.; Schulmeister, K.: Report: Sonnenschutzmittel für die Haut. URL: http://esv-sva.sozvers.at/mediaDB/554573_Sonnenschutzmittel%20f%C3%BCr%20die%20Haut.pdf, verfügbar am 17.06.2011

Anlagen

Teil 1A

Teil 2B

Teil 3C

Anlagen, Teil 1

Messwerte zum SDS-abhängigen RBC-Test (vgl 4.2.4)

414 nm				
Bezeichnung	Absorption		MW	% Hämolys
100%-Hämolys	0,45	0,46	0,45	100,00
0%-Hämolys	0,04	0,04	0,04	9,35
0,01 mg/ml	0,03	0,03	0,03	6,71
0,02 mg/ml	0,39	0,38	0,39	84,82
0,03 mg/ml	0,41	0,41	0,41	89,88
0,04 mg/ml	0,43	0,43	0,43	93,84
0,05 mg/ml	0,40	0,40	0,40	88,56

405 nm				
Bezeichnung	Absorption		MW	% Hämolys
100%-Hämolys	0,34	0,33	0,33	100,00
0%-Hämolys	0,04	0,04	0,04	10,46
0,01 mg/ml	0,02	0,02	0,02	6,28
0,02 mg/ml	0,28	0,29	0,28	85,05
0,03 mg/ml	0,30	0,30	0,30	89,84
0,04 mg/ml	0,32	0,31	0,32	94,47
0,05 mg/ml	0,30	0,30	0,30	90,13

Anlagen, Teil 2

Messwerte zur Bestimmung des Einflusses der Bestrahlungsdauer (vgl. 4.2.6)

Zeit in min	Absorption bei 414 nm								MW	STABW
5	0,037	0,032	0,027	0,033	0,043	0,034	0,037	0,048	0,036	0,007
15	0,046	0,052	0,042	0,047	0,051	0,051	0,062	0,062	0,052	0,007
30	0,049	0,040	0,060	0,067	0,063	0,057	0,044	0,054	0,054	0,009
45	0,056	0,057	0,051	0,058	0,062	0,051	0,062	0,065	0,058	0,005
60	0,086	0,084	0,082	0,080	0,094	0,089	0,090	0,080	0,086	0,005
75	0,110	0,103	0,105	0,096	0,101	0,089	0,130	0,109	0,105	0,012
90	0,189	0,207	0,193	0,202	0,220	0,235	0,229	0,225	0,213	0,017
120	0,230	0,217	0,225	0,218	0,231	0,225	0,227	0,230	0,225	0,005
180	0,219	0,225	0,220	0,228	0,235	0,223	0,231	0,223	0,226	0,006
240	0,221	0,229	0,230	0,225	0,227	0,222	0,225	0,223	0,225	0,003

Anlagen, Teil 3

Messwerte zum RBC-Photohämolysetest für Sonnenschutzcreme (vgl. 4.2.7)

LSF 6	Absorption bei 405 nm, ohne UV						MW	% Hämolysse
100%	0,241	0,244	0,243	0,250	0,244	0,239	0,244	100,00
0%	0,011	0,014	0,021	0,010	0,019	0,023	0,016	6,71
0,02	0,012	0,010	0,028	0,005	0,004	0,008	0,011	4,59
0,04	0,009	0,013	0,011	0,006	0,010	0,016	0,011	4,45
0,06	0,016	0,016	0,024	0,005	0,005	0,008	0,012	5,07
0,08	0,017	0,019	0,017	0,018	0,016	0,011	0,016	6,71
0,1	0,020	0,021	0,024	0,012	0,014	0,015	0,018	7,26
0,15	0,036	0,034	0,034	0,024	0,029	0,034	0,032	13,07
0,2	0,070	0,064	0,062	0,067	0,069	0,078	0,068	28,06
0,25	0,168	0,147	0,161	0,132	0,134	0,127	0,145	59,48
0,5	0,199	0,199	0,193	0,204	0,212	0,209	0,203	83,23
0,75	0,213	0,232	0,274	0,182	0,206	0,214	0,220	90,42

LSF 6	Absorption bei 405 nm, mit UV						MW	% Hämolysse
100%	0,298	0,305	0,304	0,212	0,206	0,200	0,254	100,00
0%	0,120	0,124	0,125	0,136	0,137	0,143	0,131	51,48
0,02	0,247	0,250	0,250	0,274	0,263	0,260	0,257	101,25
0,04	0,260	0,262	0,261	0,238	0,243	0,232	0,249	98,10
0,06	0,246	0,243	0,245	0,260	0,242	0,245	0,247	97,11
0,08	0,227	0,228	0,230	0,246	0,256	0,260	0,241	94,89
0,1	0,243	0,246	0,253	0,232	0,235	0,237	0,241	94,82
0,15	0,244	0,246	0,241	0,248	0,240	0,246	0,244	96,07
0,2	0,242	0,247	0,251	0,238	0,240	0,254	0,245	96,52
0,25	0,228	0,233	0,235	0,251	0,251	0,232	0,238	93,77
0,5	0,202	0,240	0,268	0,245	0,228	0,246	0,238	93,70
0,75	0,208	0,241	0,268	0,217	0,242	0,246	0,237	93,25

LSF 50	Absorption bei 405 nm, ohne UV						MW	% Hämolyse
100%	0,355	0,358	0,360	0,371	0,369	0,372	0,364	100,00
0%	0,024	0,028	0,031	0,025	0,033	0,041	0,030	8,33
0,02	0,025	0,024	0,024	0,026	0,031	0,014	0,024	6,59
0,04	0,027	0,029	0,032	0,028	0,034	0,036	0,031	8,51
0,06	0,043	0,037	0,036	0,038	0,040	0,032	0,038	10,34
0,08	0,045	0,037	0,045	0,055	0,061	0,071	0,052	14,37
0,1	0,050	0,056	0,050	0,054	0,063	0,053	0,054	14,92
0,15	0,116	0,101	0,101	0,053	0,056	0,068	0,083	22,65
0,2	0,232	0,231	0,235	0,218	0,227	0,234	0,230	63,02
0,25	0,313	0,325	0,317	0,351	0,361	0,347	0,336	92,17
0,5	0,381	0,389	0,380	0,347	0,378	0,379	0,376	103,16
0,75	0,380	0,381	0,381	0,387	0,388	0,377	0,382	104,99

LSF 50	Absorption bei 405 nm, mit UV						MW	% Hämolyse
100%	0,416	0,416	0,414	0,434	0,431	0,421	0,422	100,00
0%	0,136	0,135	0,136	0,155	0,147	0,142	0,142	33,61
0,02	0,391	0,389	0,399	0,390	0,398	0,415	0,397	94,08
0,04	0,411	0,417	0,414	0,423	0,427	0,416	0,418	99,05
0,06	0,396	0,416	0,430	0,430	0,421	0,417	0,418	99,13
0,08	0,416	0,418	0,419	0,418	0,419	0,417	0,418	99,01
0,1	0,409	0,407	0,409	0,434	0,425	0,432	0,419	99,37
0,15	0,425	0,433	0,433	0,435	0,435	0,426	0,431	102,17
0,2	0,440	0,436	0,439	0,437	0,435	0,438	0,438	103,67
0,25	0,437	0,445	0,440	0,435	0,437	0,437	0,439	103,91
0,5	0,438	0,441	0,444	0,438	0,437	0,441	0,440	104,23
0,75	0,443	0,436	0,443	0,434	0,442	0,440	0,440	104,19

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Lichtenstein, den 25.08.2011

Isabell Saleski